

**Physiologie und Physiotaxonomie
einiger Vertreter der Gattung
Haemophilus Winslow et al.**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)**

**vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn**

von

**REINHARD HOLLÄNDER

aus Bottrop**

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg

**Physiologie und Physiotaxonomie
einiger Vertreter der Gattung
Haemophilus Winslow et al.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

vorgelegt dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg/Lahn

von

REINHARD HOLLÄNDER

aus Bottrop

Marburg/Lahn 1976

Druck: Mauersberger, Marburg



Vom Fachbereich Biologie der
Philipps-Universität Marburg/Lahn
als Dissertation angenommen am: 19.1.1976
Tag der mündlichen Prüfung am: 4.2.1976

Berichterstatter:	Prof. Dr. E. Geyer
Mitberichterstatter:	Prof. Dr. W. Mannheim

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Abkürzungen	1
Einleitung	2
I. Wachstumsfaktorbedürfnisse der Bakterien der <u>Haemophilus</u> -Gruppe	2
II. Katabole Stoffwechselprozesse	4
III. Die Atmungskette von <u>H. parainfluenzae</u>	4
IV. Die gegenwärtige Situation der <u>Haemo-</u> <u>philus</u> -Gruppe	5
V. Atmungskettenbestandteile als klassifi- zierende Kriterien	6
1. Cytochrome	7
2. Chinone	7
VI. Chinone und Cytochrome im terminalen Elektronentransport chemoorganotropher Bakterien	8
1. Bakterien, die Ubichinon als einziges Chinon enthalten	8
2. Bakterien mit Menachinon	9
3. Bakterien mit Desmethylmenachinon	10
4. Bakterien, die Ubichinon und Menachinon als Atmungschinone verwenden	10
VII. Motivation zur vorliegenden Arbeit	11
Material und Methoden	13
I. Bakterien	13
II. Nährmedien	13
1. Mineral- Basis	13
2. Proteose-Pepton-Medium	13
3. Fisch-Pepton-Medium	13
4. Leberbouillon	13
5. Fleischbouillon	13

	Seite
6. Tryptic- Soy-Agar	13
7. Kochblut-Agar	13
8. Casman's Agar	14
9. Haematin-Stammlösung	14
10. Protoporphyrin-Stammlösung	14
11. Fumarat-Stammlösung	14
12. NAD-Stammlösung	14
III. Anzüchtung der Bakterien	14
IV. Massenkultur	15
1. Vorkultur	15
2. Hauptkultur	15
3. Ernte	15
V. Desintegration der Bakterienzellen	16
VI. Prüfung der biochemischen Leistungen	16
VII. Wachstumskurven	16
VIII. Enzymtests	17
IX. Glucose- und Lactatverbrauch	18
X. Atmungsraten	18
XI. Membranbindung von Cytochromen und Chinonen	18
XII. Bestimmung des Chinongehalts	19
XIII. Bestimmung des Cytochromgehalts	20
XIV. Tieftemperaturdifferenzspektren	21
XV. Bestimmung der funktionellen Bedeutung der Cytochrome	21
XVI. Hemmstoffe	21
XVII. Analyse der Chinonfunktion durch Extraktion und Reinkorporation	22
1. Lyophilpartikel	22
2. Extraktion der Chinone	22
3. Chinonreinkorporation	23

	Seite
XVIII. Proteinbestimmung	23
XIX. Chemikalien	23
Ergebnisse	23
I. Phänotypische Charakterisierung der <u>Haemophilus</u> -Gruppe	24
1. Kulturell-biochemische Leistungen	24
2. Cytochrom- und Chinongehalte unter aero- ben Bedingungen bzw. Sauerstofflimitation	25
II. Der Kohlenhydratstoffwechsel einiger charakteristischer Vertreter der Gattung <u>Haemophilus</u>	26
1. Der Einfluß verschiedener Substrate auf die Wachstumserträge	26
2. Der zeitliche Ablauf des Glucose- und Lactatabbaus in Gegenwart unterschiedlicher terminaler Elektronenakzeptoren	27
3. Die Aktivität katabolisierender Enzymsyste- me nach Auskunft der Atmungsraten	27
4. Die Aktivitäten der am Kohlenhydratkatabo- lismus beteiligten Enzyme	28
III. Der terminale Elektronentransport eini- ger Vertreter der Gattung <u>Haemophilus</u>	29
1. Die Löslichkeit von Cytochromen und Chinonen	29
2. Cytochrom- und Chinongehalte nach Kultivie- rung mit verschiedenen Substraten	30
3. Tieftemperaturdifferenzspektren der Cyto- chrome nach aerober und anaerober Kultivie- rung	31
4. Der Einfluß verschiedener Substrate auf die Aktivität des terminalen Elektronentransports	31
5. Der Einfluß verschiedener terminaler Elek- tronenakzeptoren auf die Wachstumserträge	32

6. Der Einfluß unterschiedlicher Haematin- konzentrationen auf Ertrag, Atmungsakti- vität, Cytochrom- und Chinongehalt bei <u>H. influenzae</u>	33
7. Die Hemmung des terminalen Elektronen- transports durch verschiedene spezifi- sche Hemmstoffe	33
8. Die Reduzierbarkeit der Cytochrome durch Substrate	34
9. Die Beteiligung der Chinone am terminalen Elektronentransport	37
Diskussion	41
I. Der Kohlenhydratkatabolismus einiger Ver- treter der <u>Haemophilus</u> -Gruppe	41
1. Wachstumsverhalten und Kohlenhydratabbau	41
2. Die Enzymsysteme des Kohlenhydratstoff- wechsels	42
II. Der terminale Elektronentransport von Vertretern der <u>Haemophilus</u> -Gruppe	44
1. Der Einfluß des Substrats auf die Atmungs- kettenbestandteile	44
2. Die Lokalisation von Chinonen und Cyto- chromen	47
3. Die Rolle der Chinone im terminalen Elektronentransport	48
4. Die Rolle der Cytochrome im terminalen Elektronentransport	50
5. Die Atmungskette von <u>H. parainfluenzae</u> 1 Fleming	52
6. Die Atmungskette von <u>H. influenzae</u> RAMC 18 Bensted	56
7. Die Atmungskette von <u>H. parainfluenzae</u> 429 Pittman	59

	Seite
II. Die Verwendung phänotypischer Kriterien als Grundlage zur Taxonomie	61
1. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Vertreter der <u>Haemophilus</u> -Gruppe	61
2. Die Evolution der Chinone	64
Zusammenfassung	69
Tabellen	73
Abbildungen	108
Literaturverzeichnis	129

Abkürzungen

ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA

BTrS: Bakterientrockensubstanz

C-Quelle: Kohlenstoffquelle

DH: Dehydrogenasen

DMK: Desmethylmenachinon

EC: Enzyme Nomenclature, 1973

gProtein: Proteingehalt in Gramm

HIH: Hygiene-Institut Heidelberg, Bakterienstammsammlung

HIM: Hygiene-Institut Marburg, Bakterienstammsammlung

HQNO: 2-Heptyl-4-Hydroxyquinoline N-Oxide

Konz.: Konzentration

MK: Menachinon

NAD: Nicotinamid-adenin-dinucleotid

NADH: Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert

NADPH: Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert

KDPG: 2-Keto-3-Desoxy-6-Phospho-D-Gluconsäure-Ba-Salz

NCTC: National Collection of Type Cultures, London,
England

O-F-Test: Oxydations-Fermentationstest

PEP: Phosphoenolpyruvat

PP: Proteose-Pepton-Medium

Q: Ubichinon

TMPD: N,N,N',N'-Tetramethyl-1,4-phenylendiamindihydrochlorid

Tris: Tris (Hydroxymethyl) aminomethan

TTA: 1- [Thenoyl-(2)] -3,3,3-trifluoroaceton

Einleitung

I. Wachstumsfaktorbedürfnisse der Bakterien der Haemophilus-Gruppe

Seit der Entdeckung und Beschreibung von Influenza-Bakterien durch PFEIFFER (1892, 1893) wurden eine Anzahl kleiner gram-negativer, unbeweglicher Stäbchen wegen ihrer besonderen Wachstumsfaktoransprüche in die nähere Verwandtschaft dieser Bakterien gebracht.

Das gemeinsame Merkmal, das diese Gruppe von anderen Bakteriengruppen trennt, ist ihre Bedürftigkeit für Haemin bzw. Protoporphyrin einerseits und/oder NAD andererseits als notwendige Nährbodenzusätze. Allerdings gelang die Aufklärung der chemischen Natur dieser zum Wachstum notwendigen Substanzen erst viel später.

Schon PFEIFFER (1893) erkannte die Wachstumstimulierung nach Zugabe von Blut zum Kulturmedium, die jedoch nicht durch die Verwendung von kristallinem Hämoglobin allein erreicht werden konnte (GHON & v. PREYSS, 1902, 1904; THALIMER, 1914; DAVIS, 1917; OLSEN, 1920; FILDES, 1921). CANTANI (1897, 1901, 1902) machte einige von Porphyrinderivaten verschiedene Stoffe für die Wachstumsförderung verantwortlich, übersah aber, daß seine Agarnährböden Spuren von Haematin enthielten. Er zeigte aber ebenso wie GRASSBERGER (1897), daß einige Kontaminanten ebenfalls ein "Satellitenwachstum" (DAVIS, 1921) der Influenza-Bakterien erlaubten.

Die Notwendigkeit einer zweiten Substanz, die chemisch von Haemin verschieden war, wies erstmals DAVIS (1917) nach, der diesen Stoff als "Vitamin" bezeichnete und das Vorkommen in frischen pflanzlichen Geweben aufdeckte. Aber erst die Arbeiten von THJÖTTA (1921), THJÖTTA & AVERY (1921 a,b), FILDES (1921) und RIVERS & POOLE (1921) zeigten, daß diese beiden Aktivitäten voneinander trennbaren, im Blut vorhandenen Substanzen zuzuordnen sind, wobei die hämoglobinähnliche, hitzestabile "X-Faktor", die hitzelabile "V-Faktor" (= vitaminähnlich) genannt wurde. Diese Faktoren kommen nicht nur in Blutzellen, sondern auch in Hefen und in Geweben höherer Pflanzen vor.

Eine zusammenfassende Darstellung der frühen Arbeiten über haemophile Bakterien gibt SCOTT (1929).

Die Arbeiten über die chemische Natur des X- und V-Faktors fanden ihren vorläufigen Abschluß mit den Untersuchungen durch LWOFF & LWOFF (1937 a, b, c). Sie stellten fest, daß PFEIFFER's Influenza-Bakterium, - seit dem "Report of the Committee of the Society of American Bacteriologists" (WINSLOW et al., 1917) Haemophilus influenzae genannt-, Protohaemin und Pyridinnucleotide nicht selbst synthetisieren kann. Bei Fehlen von Pyridinnucleotiden werden die Dehydrogenasen, bei Fehlen von Protohaeminen die Cytochrome, Cytochromoxydasen sowie Katalasen und Peroxydasen nicht aufgebaut.

Der Vergleich mit den chemischen und physikalischen Eigenschaften von Harden und Young's Cozymase und Warburgs Coenzym I stellten sie weitgehende Übereinstimmung fest.

Weitere Untersuchungen anderer Autoren ergaben, daß der Sauerstoffverbrauch von H. influenzae nach Zugabe von Proto- oder Deuterohaemin zwar gleich ist, unter Protohaemineinfluß aber Wachstum, Nitratreduktase- und Katalaseaktivität erhöht sind. Diese Befunde ließen die Deutung zu, daß bestimmte porphyrinhaltige Enzyme von H. influenzae nur mit Protohaemin als prosthetische Gruppe aktiv sind, die Atmungsenzyme aber auch mit Haeminen, die keine Vinylgruppe enthalten, wirken können (SMITH et al., 1953).

H. influenzae kann mit verschiedenen Eisenporphyrinen wachsen, ist aber nur imstande Eisen in Protoporphyrin einzubauen, d.h. in das mit Vinylgruppen ausgestattete Tetrapyrrol der Reihe III. Eine weitere Rolle bei der Wachstumsförderung spielen die Propionsäureseitenketten (GRANICK & GILDER, 1945, 1946). Die Rate des Wachstums haemophiler Bakterien scheint von der Rate abhängig zu sein, mit welcher Porphyrine synthetisiert werden können, und von dem Schutz des Mediums gegenüber Zerstörung von Haemin durch Wasserstoffperoxyd (GILDER & GRANICK, 1947). Durch den Vergleich der wachstumsfördernden Eigenschaften verschiedener Bestandteile des NAD, konnte bei H. parainfluenzae gezeigt werden, daß diese V-Faktor bedürftigen

Bakterien die Verknüpfung der Pentose mit dem Nicotinamid nicht vollziehen können (SCHLENK & GINGRICH, 1942; GINGRICH & SCHLENK, 1944).

Die vollständige Aufklärung der Haeminbiosynthese bei drei Vertretern der Gattung Haemophilus gelang später WHITE & GRANICK (1963). Die X-Faktor bedürftigen Vertreter dieser Gattung waren außerstande δ -Aminolaevulinsäure in Protoporphyrin umzuwandeln. H.aegyptius kann außerdem Protoporphyrin nicht in Haemine umwandeln.

II. Katabole Stoffwechselprozesse

Die Aufklärung von Stoffwechselwegen von haemophilen Bakterien wird durch die notwendige Kultivierung in hochkomplexen Medien erheblich erschwert. Dies mag ein Grund sein, warum die Stoffwechselprozesse dieser Bakterien bisher so wenig Beachtung fanden. Lediglich die Untersuchungen WHITES (1966) geben einen Einblick in den Kohlenhydratkatabolismus von H. parainfluenzae Bossy No7, Leidy. Unter Berücksichtigung dieser Schwierigkeiten zeigt sich, daß dieser Stamm über die Enzyme des Emden-Meyerhof-Parnas-, des Pentose-Phosphat-Weges und des Citratcyclus verfügt. Diese Enzyme ermöglichen einen Kohlenhydratkatabolismus, der in direktem Zusammenhang mit den membrangebundenen Dehydrogenasen und dem terminalen Elektronentransport steht, und der ebenso auch ohne einen terminalen Elektronentransport nicht zustande kommt (WHITE, 1964, 1966).

III. Die Atmungskette von H. parainfluenzae

Die ungewöhnliche Permeabilität der Cytoplasmamembran für Pyridinnucleotide (WHITE, 1966) sowie die Fähigkeit Art und Menge der Cytochrome in Abhängigkeit von der Art des terminalen Akzeptors zu variieren (WHITE, 1963, 1965a) ließen eine nähere Untersuchung der Atmungskette von H. parainfluenzae Bossy No 7, Leidy, nützlich erscheinen. Neben dem Desmethylmenachinon, einem Atmungschinon, das zuerst bei Streptococcus faecalis entdeckt wurde (BAUM & DOLIN, 1963), besitzt H. parainfluenzae die Cytochrome

b, c₅₅₂, c₅₅₀, die Cytochromoxydasen a₁, a₂ und o und strukturgebundene Dehydrogenasen (WHITE & SMITH, 1962, 1965 b; LESTER et al., 1964). Die Variation dieser Cytochrome ist weitgehend unabhängig von den im Medium angebotenen Substraten (WHITE, 1967). Bei verschiedenen Belüftungsintensitäten und in den späten Wachstumsphasen einer Batchkultur, die stets sauerstofflimitiert ist, verändert sich aber die Menge der einzelnen Cytochrome erheblich (WHITE, 1962; WHITE & SMITH, 1962).

Cytochrom c kommt membrangebunden und im Cytoplasma gelöst vor. Letzteres kann im Gegensatz zum gebundenen enzymatisch nicht reduziert werden (SMITH & WHITE, 1962; WHITE, 1963). Unter anaeroben Kulturbedingungen wird anstelle des Sauerstoffs Nitrat, Pyruvat, NAD oder Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor verwendet. Zugabe dieser Akzeptoren zu anaeroben Zellkulturen hat eine Oxydation der Cytochrome zur Folge (WHITE & SMITH, 1962; SMITH et al., 1970). Sauerstofflimitierte Kultivierung mit entsprechenden Akzeptoren hat eine verstärkte Synthese von Cytochrom a₂ und o zur Folge (WHITE, 1963; SINCLAIR & WHITE, 1970). Eine Änderung des Gehalts an respiratorischen Cytochromen und Chinonen geht mit einer Änderung des Proteingehalts und mit einer Veränderung der Syntheserate von Phospholipiden einher (WHITE & TUCKER, 1967; SINCLAIR & WHITE, 1970).

Die Variation der Cytochrom- und Chinongehalte auf veränderte Bedingungen sowie die Untersuchung an einer Mutante von H. parainfluenzae, die nur ca. 10% des Cytochrom c des Wildtyps produziert, dafür aber sehr viel mehr Cytochrom b enthält (WHITE & SMITH, 1964), und alle Substrate gleich schnell wie der Wildtyp veratmet, lassen auf ein verzweigtes Elektronentransportsystem schließen. (Zusammenfassung bei WHITE & SINCLAIR, 1971).

IV. Die gegenwärtige Situation der Haemophilus-Gruppe

Die Errichtung eines eigenen Taxons im Range einer Gattung, "Haemophilus", durch das "Committee of the Society of American Bacteriologists" (WINSLOW et al., 1917) für haemophile Bakterien führte zu einer Zusammenfassung aller aeroben, unbeweglichen, gram-negativen Bakterien, die

zu ihrer Kultivierung Substanzen benötigen, die im Blut oder frischen Pflanzen vorhanden sind. Die Kriterien zur Gattungszugehörigkeit wurden später insofern eingeschränkt als die zum Wachsen benötigten Substanzen als "X- und V-Faktoren" definiert wurden.

So kommt es zur Neubeschreibung von Arten, die lediglich durch die verschiedenen Wachsfaktoransprüche voneinander getrennt werden können, sonst aber z.T. identisch mit anderen Spezies sind, wie z.B. die "Para"-Stämme, aber auch von solchen, deren Wachsfaktoransprüche nicht genau definiert sind.

Die derzeit als Mitglieder der Gattung Haemophilus beschriebenen Bakterienspezies sind in Tabelle I zusammengestellt. Jedoch ist die Zugehörigkeit sowohl einzelner Arten, als auch die systematische Stellung der Gattung in ständiger Diskussion (cf. ZINNEMANN & BIBERSTEIN, 1974).

V. Atmungskettenbestandteile als klassifizierende Kriterien

Die Klassifizierung der meisten Bakterien beruht auf dem Vergleich möglichst vieler erreichbaren phänotypischen Kriterien, wobei die verschiedenen Merkmale unterschiedlich gewichtet werden und somit eine Merkmalshierarchie die Zugehörigkeit zu einem Taxon bestimmt. Eine andere Möglichkeit zur Auswertung phänotypischer Daten besteht darin, die einzelnen Merkmale gleichgewichtig zu behandeln, was aber nur bei einer sehr großen Zahl von Einzeldaten sinnvoll ist, und die prozentuale Übereinstimmung der Merkmale bei verschiedenen Bakterienstämmen als Grundlage für Verwandtschaften heranzieht ("numerische Taxonomie").

In der bisherigen Bakterientaxonomie fanden die Bestandteile der Atmungskette nur wenig Beachtung. Erst in letzten Jahren wurden diese phänotypischen Daten zur Bakterienklassifikation herangezogen; einmal wegen der Vereinfachung der Methoden, zum anderen aber auch infolge der Erkenntnis, daß die Atmungskette in der Phylogenie durch die Möglichkeit zur effektiveren Energiegewinnung eine gewichtige Rolle spielte.

1. Cytochrome

Die Cytochrome als funktionelle Bestandteile der Atmungskette fanden schon früh Beachtung, wobei neben Einzeluntersuchungen auch erste vergleichbare Zusammenstellungen der Cytochrome einiger Bakterien gemacht wurden (KEILIN, 1925; TAMIYA & YAMAGUTCHI, 1933; FUJITA & KODAMA, 1934). Diesen frühen Daten folgten im Laufe der Zeit eine Fülle neuer Information, die sich jedoch bei den meisten Untersuchungen auf das Cytochromsystem einzelner Spezies beschränkten (cf. SMITH, 1954, 1961; BARTSCH, 1968).

Die ersten systematisch relevanten Anwendungen der Cytochrome machten STANIER et al. (1966) bei der Charakterisierung von Pseudomonas-Spezies und DAVIDSON & HARTTREE (1968), die Microbacterium thermosphactum wegen des Besitzes von Cytochromen aus der Familie Lactobacillaceae in die Nähe der Corynebakterien stellten.

Die umfassendsten Arbeiten von MEYER & JONES (1973) und SPICHER (1974 a, b, c) zeigten, daß die Cytochrome innerhalb großer Bakteriengruppen konstant sind: aerobe und fakultativ anaerobe, gram-positive, heterotrophe Bakterien synthetisieren die Cytochrome aa₃, o, b, c; aerobe und fakultativ anaerobe, gram-negative, heterotrophe bilden a₁, d, o, b, c, a₁, o, b, c oder aa₃, o, b, c, anaerobe und mikroaerophile, heterotrophe bilden b, manchmal mit a₁, d oder o, chemo- und photoautotrophe besitzen c mit a₁, aa₃ oder o oder b.

Berücksichtigt man aber die große Variationsbreite der Cytochrome je nach Kulturbedingungen, wie sie von vielen Bakterien bekannt ist, so setzt der Vergleich der Cytochromegehalte standardisierte Methoden voraus.

2. Chinone

Chinone bieten insofern eine brauchbare Klassifikationsmöglichkeit, als diese Kriterien in großen Gruppen chemoorganotropher Bakterien, - bei Berücksichtigung der phänotypischen Variabilität-, konstant sind.

Chemoorganotrophe, aerobe, gram-negative Eubacteriales und Pseudomonadales bilden lediglich Ubichinon als Atmungschinon (BISHOP et al., 1962; WHISTANCE et al., 1969;

CALLIES, 1973), wogegen viele fakultativ aerobe, fermentative, gram-negative Bakterien Ubichinon und ein Naphthochinon besitzen wie die Enterobacteriaceae, Yersinia, Vibrio und Aeromonas (WHISTANCE & THRELLFALL, 1968; WHISTANCE et al., 1969; KRÜGER et al., 1971; JEDISS, 1973; ZABEL, 1974).

Menachinon ist das respiratorische Chinon der aeroben und fakultativ anaeroben, gram-positiven Bakterien (BISHOP et al., 1962; JACOBSEN & DAM, 1960; LESTER & CRANE, 1959). Bei den fermentativen Brucellaceae, synthetisieren führende Vertreter der Gattung Pasteurella und Actinobacillus Ubichinon und Desmethylmenachinon (ZABEL, 1974). Desmethylmenachinon allein wurde bisher bei Streptococcus faecalis (BAUM & DOLIN, 1963) und Haemophilus parainfluenzae, Bossy No 7, Leidy (LESTER et al., 1964) nachgewiesen.

VI. Chinone und Cytochrome im terminalen Elektronentransport chemoorganotropher Bakterien

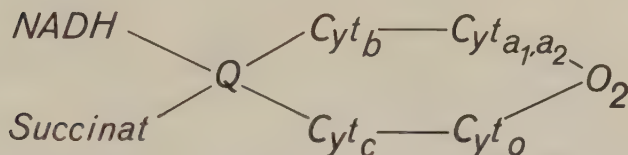
Die Fülle der Untersuchungen über einzelne Atmungskettenbestandteile und Atmungskettensysteme läßt eine Gesamtdarstellung im kleinen Rahmen nicht zu. Deswegen kann nur ein kleiner Überblick über die am eingehendsten untersuchten Elektronentransportsysteme gegeben werden, wobei die Chinonkomponenten als Orientierung dienen sollen.

1. Bakterien, die Ubichinon als einziges Atmungschinon enthalten

Als gut untersuchtes Beispiel für einen Atmungskettentyp mit Ubichinon als einzigem respiratorischen Chinon gilt das Elektronentransportsystem von Azotobacter vinelandii (KNOWLES & REDFEARN, 1966; 1968; JONES & REDFEARN, 1967 a, b) (Schema 1).

Mit Hilfe von spektrophotometrischen Methoden, in Verbindung mit Atmungskettenhemmstoffen und UV-Bestrahlungsversuchen, konnte eine Beteiligung von Ubichinon und den Cytochromen a_1 , a_2 , o, b und c nachgewiesen werden. Dabei werden Elektronen vom Succinat über Ubichinon, Cytochrom c auf Cytochrom o, vom NADH über Ubichinon, Cytochrom b

auf die Cytochrome a_1 und a_2 übertragen. Neben diesen "hauptsächlichen" Elektronentransportwegen können Elektronen auch vom NADH auf Cytochrom c über Ubichinon und vom Succinat über Ubichinon auf Cytochrom b, allerdings in geringerer Rate transportiert werden.

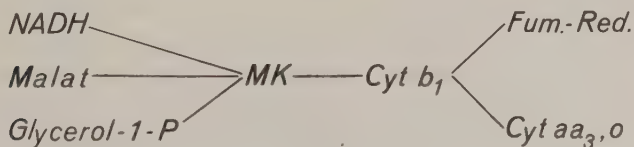


Schema 1: Atmungskette von Azotobacter vinelandii nach KNOWLES & REDFEARN (1966, 1968) und JONES & REDFEARN (1967 a, b)

2. Bakterien mit Menachinon

KRÖGER & DADAK (1969) klärten die Funktion von Menachinon zusammen mit den Cytochromen b_1 , aa_3 und o an Bacillus megaterium auf.

Menachinon stellt bei B. megaterium die Verbindung zwischen den Dehydrogenasen für NADH, Malat und α -Glycerophosphat und den Cytochromen dar. Zusätzlich zu diesem aeroben Elektronentransport vermögen die Bakterien unter anaerober Bedingungen mit Hilfe einer Fumarat-Reduktase auf Fumarat zu atmen. Die lineare Anordnung der Atmungskettenkomponenten wurde mit Hilfe der Differenzspektroskopie, Atmungskettenhemmstoffen und Extraktion der Chinone und anschließende Reinkorporation aufgeklärt (Schema 2).



Schema 2: Atmungskette von Bacillus megaterium nach KRÖGER & DADAK (1969)

3. Bakterien mit Desmethylmenachinon

Ein terminaler Elektronentransport, bei dem Desmethylmenachinon beteiligt ist, wurde bisher nur an H. parainfluenzae Bossy No 7, Leidy, durch die Untersuchungen WHITES näher aufgeklärt. Eine eingehendere Darstellung findet sich unter Kapitel III (Seite 4) der Einleitung.

4. Bakterien, die Ubichinon und Menachinon als Atmungs- chinone verwenden

Da das Vorkommen von Ubichinon und Menachinon ein Charakteristikum der Bakterien aus der Familie der Enterobacteriaceae ist, boten sich diese Bakterien wegen ihrer leichten Kultivierbarkeit als Untersuchungsobjekte an. Aber trotz vieler Arbeiten an Escherichia coli durch verschiedene Arbeitsgruppen blieben viele Widersprüche über den funktionellen Ablauf des terminalen Elektronentransports offen (cf. KRÖGER & KLINGENBERG, 1970). Erst die ausführliche Bearbeitung des Elektronentransportsystems von Proteus rettgeri brachte einige Klarheit über das Zusammenwirken von Ubichinon, Menachinon und den Cytochromen (KRÖGER et al., 1971). Durch die Anwendung der gleichen Methoden wie bei Bacillus megaterium konnte ein verzweigter Elektronentransport aufgezeigt werden, bei dem die Elektronen sowohl vom NADH als auch vom Formiat auf Menachinon bzw. Ubichinon übertragen werden. Das ermöglicht eine aerobe Atmung auf Sauerstoff und eine anaerobe Atmung über Menachinon mit Fumarat (Schema 3).

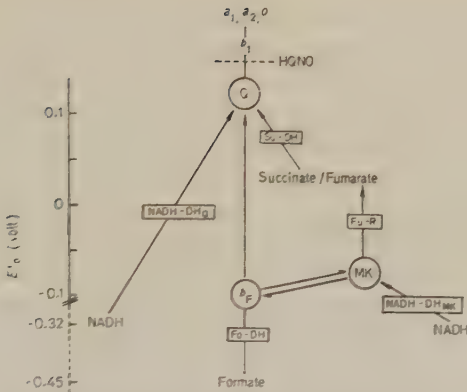


Fig. 8. Pathways of electron transport of *P. rettgeri* taking into account the approximate redox potentials. References of redox potentials: Q, MK [27], NADH [28], formate [29], succinate [30]. Fu-R = fumarate reductase, Fo-DH = formate dehydrogenase, Su-DH = succinic dehydrogenase; HQNO = 2-n-heptyl-4-hydroxyquinoline-N-oxide

Schema 3: Atmungskette von Proteus rettgeri aus KRÖGER et al. (1971)

VII. Motivation zur vorliegenden Arbeit

Wie viele parasitisch lebende Mikroorganismen verfügen die Bakterien der Haemophilus-Gruppe nur über eine beschränkte Zahl von Syntheseleistungen. Die auffallende Unfähigkeit Pyridinnucleotide und/oder Porphyrine zu synthetisieren, weist diese Gruppe als obligate Parasiten aus (cf. LWOFF, 1938).

Geht man von der Annahme aus, daß ungefähr 1 000 Cistren für die Synthese der verschiedenen Proteine notwendig sind, ca. 100 Cistren die Gestalt der Bakterienzelle bestimmen oder für die Fermentation der Glucose schon 20-30 Cistren ihre Information in Enzymproteine weitergeben müssen (DE LEY, 1969), so muß man für ein Bakterium mit den unterschiedlichen Stoffwechselleistungen wenigstens 1 000 Cistren erwarten. Pseudomonas fluorescens besitzt etwa 2 300, Escherichia coli etwa 3 000 Cistren (PARK & DE LEY, 1967). Haemophilus influenzae verfügt nur über 800 Cistren (BERNIS & THOMAS, 1965); die kleinere Zahl

der Enzymsynthesen mag unter den Selektionsbedingungen zu einer parasitischen Lebensweise geführt haben. Neben dieser ungewöhnlichen Genomgröße verfügen die meisten der haemophilen Bakterien über das im Bakterienreich nur wenig verbreitete respiratorische Chinon Desmethylmenachinon, das allein oder mit Ubichinon als Atmungskettenbestandteil isoliert werden kann (LESTER et al., 1964; HOLLÄNDER & MANNHEIM, 1975).

Die vorliegende Untersuchung sollte zum besseren Verständnis der Hauptwege des Energiestoffwechsels führen. Dabei waren einerseits die löslichen Enzyme, die zum Abbau von Kohlenhydraten notwendig sind, andererseits aber auch die strukturgebundenen Bestandteile des Elektronentransportsystems, besonders die Funktion von Desmethylmenachinon allein oder zusammen mit Ubichinon von Interesse.

Das bisherige Klassifikationsprinzip der haemophilen Bakterien, das ja lediglich durch die X- und V-Faktoren bestimmt wird, könnte durch die stoffwechselphysiologischen Erkenntnisse eine neue Grundlage bekommen, da die phylogenetische Einheitlichkeit einer Gruppe sich in vielen phänotypischen Merkmalen der Gruppenmitglieder äußert. Zusammen mit den von HOLLÄNDER & MANNHEIM (1975) aufgrund des Chinongehalts aufgestellten Verwandtschaftsbeziehungen werden die stoffwechselphysiologischen Daten möglicherweise neue Einblicke in die systematischen Verhältnisse möglichst aller verfügbaren Haemophilus-Spezies bringen.

Material und Methoden

I. Bakterien

Die untersuchten Bakterienstämme sind in Tabelle II zusammengefaßt. Vergleichende stoffwechselphysiologische Untersuchungen wurden an H. aegyptius 180a Pittman, H. influenzae RAMC 18 Bensted, H. parainfluenzae 429 Pittman und H. parainfluenzae 1 Fleming durchgeführt.

Als X- und V-Faktor produzierender Keim diente Acinetobacter spec. (Achromobacter metalcaligenes) HIH 661/60. Das bei den Chinonuntersuchungen verwendete Desmethylmenachinon wurde aus H. parainfluenzae Bossy No 7, Leidy, das Menachinon aus Bacillus cereus Lederle No 7 (NCTC 8035) isoliert.

II. Nährmedien

1. Mineral-Basis (KAUFFMANN, 1954)
2. Proteose-Pepton-Medium (Difco No 3, Detroit, USA)
(WHITE & SMITH, 1962)
3. Fisch-Pepton-Medium (Medium 69 ATCC-Catalogue 1972)
4. Leberbouillon

Rinderleber wurde autoklaviert (15 min, 120°C), anschließend in fingerdicke Streifen geschnitten, mit dem doppelten Volumen Fleischbouillon überschichtet und erneut autoklaviert.

5. Fleischbouillon

Fleischextrakt (Merck, Darmstadt)	0,8 % (w/v)
NaCl (Merck, Darmstadt)	0,3 % (w/v)
Na ₂ HPO ₄ (Merck, Darmstadt)	0,2 % (w/v)
Pepton (Witte, Frankfurt)	1 % (w/v)
Leitungswasser	100 % (v/v)

6. Tryptic-Soy-Agar (Difco, Detroit, USA)

7. Kochblutagar

Zum hitzesterilisierten, auf 80°C abgekühlten Tryptic-Soy-Agar wurde 5% (v/v) steriles Hammelblut gegeben und 20 min auf 80°C erhitzt.

8. Casman's Agar (Difco, Detroit, USA)

9. Haematin-Stammlösung ("X-Faktor")

Pulverisiertes Haeminchlorid (Ferriprotoporphyrin-chlorid) (Fluka AG, Buchs, Schweiz) wurde in 4% (v/v) Triäthanolamin (Merck, Darmstadt) wässrig gelöst, durch eine Schott G5-Fritte (Schott & Gen., Mainz) sterilfiltriert und anschließend für max. 2 Monate bei 4°C im Dunkeln aufbewahrt.

10. Protoporphyrin-Stammlösung

Protoporphyrin IX (Sigma, St. Louis, USA) wurde mit 0,05 ml/mg 96% Äthanol versetzt und in 0,1 M Na_2HPO_4

1 ml/mg bei 30°C gelöst. Zur Endkonzentration von 50 µg/ml wurde mit Mineralbasis (36°C) aufgefüllt. Noch im warmen Zustand wurde die Lösung durch eine Schott G5-Fritte vor Licht geschützt sterilfiltriert. Das Filtrat wurde in 5 ml Mengen bei 4°C im Dunkeln für max. 2 Monate aufbewahrt.

11. Fumarat-Stammlösung

Na_2 -Fumarat (Fluka AG, Buchs, Schweiz), 1 M, wurde wässrig durch eine Schott G5-Fritte sterilfiltriert.

12. NAD-Stammlösung ("V-Faktor")

0,5 mg NAD (Merck, Darmstadt) wurden pro ml Mineral-Basis gelöst, durch eine Schott G5-Fritte sterilfiltriert und in 2 ml Mengen bei -24°C eingefroren.

Andere, nicht als Nährmedienzusätze verwendeten Chemikalienlösungen werden unter den jeweiligen speziellen Versuchsanordnungen genannt.

III. Anzüchtung der Bakterien

Die Anzüchtung der Bakterien erfolgte aus lyophilisierten Kulturen auf Kochblutagar, Tryptic-Soy-Agar und in Proteose-Pepton-Medium mit Zusätzen von 1% (v/v) an NAD- und Haematinstammlösung. X- und V-Faktoren waren jeweils im Überschuss vorhanden. Die Kulturen wurden im Kerzentopf bei erhöhtem CO_2 -Gehalt bebrütet.

Die Bebrütungstemperatur betrug für alle Bakterien 37°C, ausgenommen H. piscium. Dieser Stamm wurde bei 20°C kultiviert.

IV. Massenkultur

Zur Ernte größerer Bakterienmassen wurde bei allen Versuchen prinzipiell gleich verfahren.

1. Vorkultur

Vorkulturen wurden aus Einzelkolonien von Agarplatten in die unter III. genannten Medien gemacht. Je nach Wachsfaktoranspruch wurden die Medien mit X- und/oder V-Faktor versetzt.

Das Einsaatvolumen aus spätexponentiellen Vorkulturen für die Hauptkultur betrug ca. 1% (v/v) der Hauptkultur.

2. Hauptkultur

2 000 ml fassende Fernbachkolben wurden bei aerober Bebrütung mit 400 ml, bei sauerstofflimitierter Bebrütung mit 2 000 ml Medium beschickt. Anaerobe Kulturen wurden in 2 000 ml fassende Erlenmeyerkolben hergestellt. Anaerobe Verhältnisse wurden durch 30-minütiges Durchblasen des Mediums mit sterilem, sauerstofffreiem Stickstoff und Verschluss der Kolben durch einen Gummistopfen erreicht. Sauerstofflimitierte und anaerobe Kulturen erhielten zusätzlich als terminale Elektronenakzeptor 100 ml der Fumaratstammlösung ($\approx 0,05$ M).

Die für aerobe Bebrütung bestimmten Kulturen blieben nach der Beimpfung stehen, bis sich eine leichte Trübung des Mediums zeigte. Erst dann wurde im Rundsüttelinkubator (Frequenz 200/min, Mod.G-25, New Brunswick Scientific Co, New Brunswick, USA) weiterbebrütet.

Anaerobe und sauerstofflimitierte Kulturen wurden stehend bebrütet.

3. Ernte

Zellen der spätexponentiellen Phase wurden nach Reinheitskontrolle, Bestimmen der Trübung und des pH-Wertes bei 10 000xg und 4°C sedimentiert und in Tris-HCl-Puffer,

0,1 M, pH 7,2, zweimal gewaschen. Die für funktionelle Untersuchungen geernteten Zellen wurden sofort weiterverarbeitet; für die anderen Experimente wurden die Zellen bei -24°C eingefroren.

V. Desintegration der Bakterienzellen

Bakterienzellen wurden entsprechend der Versuchsanordnung 10 x 5 sec bei einer Temperatur von 0°C durch ein Branson Sonifier B-12 Ultraschallgerät (Branson Sonic Power Co, Danbury, USA) beschallt und der Desintegrationsgrad mikroskopisch geprüft.

VI. Prüfung der biochemischen Leistungen

Biochemische Leistungen der Bakterien wurden in sog. "Bunten Reihen" entsprechend der Standardisierung für Enterobacteriaceae (KAUFFMANN, 1954) geprüft. Die Medien waren in der Nährbodenküche des Hygiene-Instituts, Marburg, hergestellt worden.

Sie wurden mit einer Bakteriensuspension von ca. 0,01 mg BTrS/ml beimpft. Als Helferkeim zur Produktion von NAD und Protoporphyrin diente Acinetobacter spec. HIH 661/60 (DOSS & MANNHEIM, 1967). Die Kulturen wurden stehend bebrütet und 21 Tage lang jeden Tag ausgewertet. Zur Prüfung der biochemischen Leistungen von H. aegyptius wurde jedes Röhrchen zusätzlich mit NAD und Haematin (1% (v/v)) zur Prüfung der Leistungen von H. vaginalis jedes Röhrchen zusätzlich mit 2 ml Leberbouillon beschickt.

Die Oxydase-Reaktion wurde mit TMPD (purum, Fluka AG, Buchs, Schweiz) nach GORDON & McLEOD (1928) bestimmt. Zur Bestimmung der X- und V-Faktor-Bedürftigkeit wurde das Wachstum der Bakterien in einem X- und V-Faktor freien Medium nach Zusatz entsprechender Supplementierungen turbidimetrisch verfolgt.

VII. Wachstumskurven

Das Wachstum der Kulturen wurde in kalibrierten Reagenzgläsern durch punktuelle Messung der Trübung bei 578 nm in einem Spezialküvettenhalter für zylindrische Gefäße

(Nr. 115320), Photometer Eppendorf (Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) verfolgt. Aerobe Kulturen wurden durch Schütteln von 13 x 180 mm großen Reagenzgläsern mit 5 ml Medium, die in einem Winkel von 8° geneigt wurden, im Reziproschüttler bei einer Amplitude von 7 cm und einer Frequenz von 60/min hergestellt. Anaerobe Kulturen wurden in kalibrierten Thunberggröhrchen stehend bebrütet, die nach Beschickung mit Medium und Zusätzen an der Wasserstrahlpumpe evakuiert wurden. Je nach spezieller Versuchsanordnung wurden die Kulturgefäße mit Proteos-Pepton-Medium, den entsprechenden Wachsfaktoren, NAD 5 $\mu\text{g/ml}$ und/oder Haematin 0,5 $\mu\text{g/ml}$ und den entsprechenden Substraten bzw. Elektronenakzeptoren beschickt.

VIII. Enzymtests

Die Enzymaktivitäten wurden in spätexponentiellen Zellen bestimmt. Dazu wurden die zweimal in Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 7,2, gewaschenen und beschallten Bakterien 1 Std bei 123 000x zentrifugiert (Ultrazentrifuge Beckman Spinco L 265 B, Beckman Instruments Inc., Palo Alto, USA) und der partikelfreie Überstand zur Bestimmung der Aktivitäten löslicher Enzyme nach folgenden Methoden verwendet: Pyruvat-Kinase (EC 2.7.1.40) (BÜCHER & PFLEIDERER, 1955), Isocitrat-DH (EC 1.1.1.42), Aconitase (EC 4.2.1.3) und Citrat-Lyase (EC 4.1.3.6) (KRÖGER, 1974), Fumarase (EC 4.2.12) (MASSEY, 1955), Malat-DH (EC 1.1.1.37) (BERGMAYER & BERNT, 1974 a), Fructose-1,6-Diphosphat-Aldolase (EC 4.1.2.13) wurde mit Hilfe eines standardisierten UV-Tests der Fa. Boehringer (Mannheim) ermittelt, Lactat-DH (EC 1.1.1.27) (BERGMAYER & BERNT, 1974 b), Malat-Enzym (EC 1.1.1.40) (TAKEO, 1969), PEP-Carboxy-Kinase (EC 4.1.1.49) (SCRUTTON, 1971), KDPG-Aldolase (WOOD, 1971). 6-Phosphogluconat-DH (EC 1.1.1.43) (KING, 1974) und NADH-Fumarat-Reduktase (EC 1.3.1.6) (KRÖGER et al., 1971) wurden in der beschallten Bakteriensuspension nachgewiesen.

IX. Glucose- und Lactatverbrauch

Der Glucose- und Lactatgehalt der Kulturen wurde im zellfreien Kulturmedium nach Zentrifugation, 10 min, 14 000xg, nach Standardmethoden der Fa. Boehringer (Mannheim) (Boehringer, 1973, 1974) ermittelt. Glucose wurde nach der Hexokinase-Methode bestimmt, Lactat durch die Umsetzung mit Hilfe einer Lactat-DH aus Schweineherz (Merck, Darmstadt) .

X. Atmungsraten

Die Sauerstoffaufnahme durch frisch geerntete und zweimal in Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 7,2, gewaschene Zellen wurde nach Zusatz verschiedener Substrate (Tabelle VII) mit einer Teflon-beschichteten pO_2 -Elektrode vom Clark-Typ polarographisch gemessen. Ein Magnetrührer sorgte für gleichmäßige Durchmischung der Bakteriensuspension mit den jeweiligen Substraten. Die Reaktionstemperatur betrug konstant 25°C. Die getesteten Substrate wurden in 1M Konzentrationen, auf pH 7,2 justiert, verwendet. Der O_2 -Verbrauch wurde unter Berücksichtigung des Bunsen-koeffizienten für Ringer-Lösung (UMBREIT et al., 1964) berechnet.

XI. Membranbindung von Cytochromen und Chinonen

Die Membranbindung von Atmungskettenbestandteilen wurde an spätexponentiell, aerob gewachsenen Bakterienkulturen geprüft. Dazu wurden die Zellen beschallt und ein Aliquot der desintegrierten Bakterien zur Messung der NADH-Oxydase, NADH-Fumarat-Reduktase, Atmungsraten, des Cytochrom- und Chinongehaltes verwendet. Ein Aliquot wurde zunächst zur Abtrennung ganzer Zellen 10 min bei 14 000xg zentrifugiert; anschließend wurde der Überstand mit Membranresten und Cytoplasmabestandteilen einer Ultrazentrifugation, 1Std bei 125 000xg, unterworfen und Überstand und Sediment jeweils auf NADH-Oxydase, NADH-Fumarat-Reduktase, Atmungsrate, Cytochrom- und Chinongehalt getestet.

XII. Bestimmung des Chinongehalts

Der Chinongehalt wurde im Methanol-Petroläther-Extrakt bestimmt. Die Chinone wurden anhand des charakteristischen differenzspektrophotometrischen Bildes identifiziert. Desmethylmenachinon wurde durch das Minimum bei 265 nm, eine Schulter bei 260 nm und durch den sehr steilen Anstieg nach 265 nm (WHITE, 1965 a) und Ubichinon durch das breite Minimum bei 275 nm (KRÖGER & KLINGENBERG, 1970) bestimmt.

Die Differenzspektren des reduzierten minus oxydierten Zustandes wurden mit einem HITACHI PERKIN Elmer Recording Spectrophotometer EPS-3T (Hitachi Ltd., Tokyo, Japan) aufgenommen.

Die Chinone wurden dünnschichtchromatographisch getrennt und auf Ubichinonanteile überprüft:

Dünnschichtplatte: DC-Fertigplatte Kieselgel 60 (Merck, Darmstadt)

Fließmittel: 15 % (v/v) Äthylmethylketon in Hexan (DUNPHY et al., 1971)

Nachweisreagenz: 50 % (v/v) abs. Äthanol in a. dest.
+ 0,05 % (v/v) α, α' -Bipyridyl
+ 0,1 % (v/v) FeCl_3
(WHISTANCE et al., 1969)

Fließmittel und Nachweisreagenz waren p.a. Substanzen (Merck, Darmstadt).

Die Nachweisgrenze für Ubichinon lag bei 1,3 nmol. Aus dem differenzspektrophotometrischen Bild wurde die Menge der Chinone anhand folgender Extinktionskoeffizienten bestimmt:

$$\Delta \epsilon_{280-289}^{\text{Q}} = - 8,8 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \quad (\text{KRÖGER et al., 1971})$$

$$\Delta \epsilon_{246-265}^{\text{DMK}} = 26,7 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1} \quad (\text{WHITE, 1965 a})$$

Mischspektren aus Ubichinon und Desmethylmenachinon wurden mit Hilfe einer Gleichung nach KRÖGER et al. (1971) unter Berücksichtigung folgender Extinktionskoeffizienten berechnet:

$$\Delta \epsilon_1^Q = -9,6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\Delta \epsilon_1^{\text{DMK}} = -1,4 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\Delta \epsilon_2^Q = 2,1 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

$$\Delta \epsilon_2^{\text{DMK}} = 20,2 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$$

(ZABEL, 1974)

XIII. Bestimmung des Cytochromgehaltes

Die Cytochrome wurden differenzspektrophotometrisch im Wellenlängenbereich von 360 bis 650 nm bestimmt. Das Spektrum $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduziert minus H_2O_2 -oxydiert wurde in trüben Suspensionen intakter Bakterien, die zur Entkopplung zweimal 5 sec beschallt wurden, oder im partikel-freien 125 000xg Überstand aufgenommen. Zur Verhinderung von Streuverlusten wurde ein "Diffuse Reflectance Accessory" zum EPS-3T Spektrophotometer nach dem Prinzip einer Ulbricht'schen Kugel verwendet.

Cytochromoxydasen wurden zusätzlich im Differenzspektrum $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduziert + CO minus $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduziert bestimmt. Anhand der charakterisierenden Minima und Maxima wurden die Cytochrome identifiziert (WHITE, 1963; BARTSCH, 1968; SMITH, 1968).

Da molare Extinktionskoeffizienten der Bakterien-cytochrome in situ in den meisten Fällen unbekannt sind, wurde die Menge der Cytochrome als Extinktionsdifferenz pro Gramm Protein und Schichtdicke angegeben. Diese Werte wurden um den Betrag der Verzerrung des Cytochrom c-Maximums bei 550 nm korrigiert, der durch den Diffuse-Reflectance-Zusatz hervorgerufen wird, indem eine bekannte Menge einer Cytochrom c-Lösung (Cytochrom c aus Pferdeherz, Fluka AG, Buchs, Schweiz) zur Referenzküvette gegeben wurde und für jede Bakteriensuspension das Spektrum $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduziert + Cytochrom c minus $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ -reduziert aufgenommen wurde.

XIV. Tieftemperaturdifferenzspektren

Tieftemperaturdifferenzspektren wurden in flüssigem Stickstoff mit Hilfe eines SHIMADZU MPS-5 000 Multi-purpose Spectrophotometer (Shimadzu Seisakusho, Ltd. Kyoto, Japan) aufgenommen.

XV. Bestimmung der funktionellen Bedeutung der Cytochrome

Die Bestimmung erfolgte wie bei der Messung des Gesamt-cytochromgehaltes. Jedoch wurden anstelle von Dithionit 100 μ l-Mengen verschiedener 1 M Substrate zur Probenküvette und H_2O_2 oder Fumarat zur Referenzküvette zugegeben und das Differenzspektrum Substrat-reduziert minus H_2O_2 oder Fumarat-oxydiert alle 2 min bis zum Erreichen des anaeroben Zustandes der Probenküvette gemessen.

XVI. Hemmstoffe

Die Wirkung von Hemmstoffen auf den terminalen Elektronentransport wurde durch die Messung der NADH-Oxydase- bzw. NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität und des Sauerstoffverbrauchs untersucht.

Die Hemmstoffe wurden in steigenden Konzentrationen den Reaktionsküvetten zugesetzt und die entsprechende Reaktion in Abhängigkeit von der Hemmstoffkonzentration registriert.

Als Hemmstoffe wurden verwendet: KCN (Merck, Darmstadt) und Natriummalonat (Schuchardt GmbH, München) gelöst in a.dest., TTA (Merck, Darmstadt) gelöst in Aceton ebenso wie Rotenon (Aldrich-Europe, Janssen GmbH, Düsseldorf); HQNO (Sigma, St. Louis, USA) gelöst in 3 N KOH und Kohlenmonoxyd gasförmig (Messer-Griesheim GmbH, Ludwigshafen).

Alle Hemmstoffe kamen frisch zubereitet zur Anwendung. Der pH betrug jeweils nach Justierung 7,2.

XVII. Analyse der Chinonfunktion durch Extraktion und Reinkorporation

Die Herstellung von lyophilisierten Membranpartikeln sowie Extraktion und Reinkorporation von Chinonen wurde nach einer wenig modifizierten Methode von ERNSTER et al. (1969) und KRÜGER (mdl. Mitteilung) vorgenommen.

1. Lyophilpartikel

Frischgeerntete Bakterien wurden zweimal in Tris-HCl-Puffer, 0,1 M, pH 7,2, gewaschen, nach der letzten Waschung in 0,3 M Saccharose-Lösung aufgenommen und anschließend beschallt.

Nach Verdünnen des Bakterienhomogenats mit 0,15 M KCl und Abzentrifugieren von noch vorhandenen intakten Zellen für 10 min bei 14 000xg wurde das Homogenat einer Ultrazentrifugation für 30 min bei 125 000xg unterworfen. Nach einer Waschung mit 0,15 M KCl und erneuter Ultrazentrifugation wurden die Membranpartikel im Trockeneis-Aceton-Gemisch eingefroren und für 8 Std lyophilisiert. Die so als Pulver erhaltenen Partikel wurden bis zur Weiterverarbeitung nach max. 1 Std über P_2O_5 aufbewahrt.

2. Extraktion der Chinone

Die Partikel wurden 8-10 mal mit jeweils 5 ml Pentan, das über Natrium getrocknet wurde, bei 0°C extrahiert, indem die Partikel mit Hilfe eines Homogenisators (Handhomogenisator, Braun, Melsungen) im Pentan homogenisiert wurden. Nach jedem Extraktionsschritt wurde die Partikelsuspension für 2 min bei 2 000xg zentrifugiert und der Überstand abdekantiert. Nach der letzten Extraktion wurden die Partikel im Rotationsverdampfer getrocknet und der Extraktionsgrad durch erneute Extraktion mit Methanol-Petroläther überprüft.

Die Abbildung 1 zeigt die Wirksamkeit der Pentanextraktion bei H. parainfluenzae 1 Fleming.

3. Chinonreinkorporation

Ubichinon, Desmethylmenachinon und Menachinon (1mg/mg Protein) wurden in 2 ml Pentan aufgenommen, den extrahierten Partikeln zugesetzt und homogenisiert. Die Suspension wurde anschließend 30 min bei 4°C geschüttelt und das Pentan am Rotationsverdampfer abgedampft. Die so erhaltenen trockenen, mit Chinon komplettierten Partikel wurden in 0,25 M Saccharose aufgenommen und unmittelbar danach die Aktivitätsmessungen durchgeführt.

XVIII. Proteinbestimmung

Der Proteingehalt wurde unter Berücksichtigung der Trübung nach der modifizierten Biuret-Methode mit KCN (SZARKOWSKA & KLINGENBERG, 1963) bestimmt.

XIX. Chemikalien

Soweit im Text noch nicht erwähnt, wurden folgende Chemikalien verwendet: L-Äpfelsäure, Phosphoenolpyruvat-Na-Salz, Na-Lactat, 6-Phosphogluconat, Glucose-1-Phosphat-Na₂-Salz, Fructose-1,6-Diphosphat-Na₃-Salz, NADH, Malat-DH und Ubichinon stammen von Serva (Heidelberg), L-Asparaginsäure-K-Salz, Na-Fumarat, L-Lysin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase von Fluka AG (Buchs, Schweiz), α -Ketoglutarsäure und Isocitrat von Boehringer (Mannheim), L-Cystein-hydrochlorid von Roth oHG (Karlsruhe). KDPG-Ba-Salz wurde freundlicherweise von Dr.Kerstens, Gent, Belgien, zur Verfügung gestellt. Die Chemikalien waren die jeweils chemisch reinsten erhältlichen, zumeist p.a. oder puriss., Substanzen. Alle nicht aufgeführten Chemikalien wurden von Merck (Darmstadt) bezogen.

Ergebnisse

I. Phänotypische Charakterisierung der Haemophilus-Gruppe

1. Kulturell-biochemische Leistungen

Das Problem der unspezifischen Säurebildung in hoch-komplexen Medien durch Vertreter der Haemophilus-Gruppe (KRISTENSEN, 1922; TUNEVALL, 1951; ALEXANDER, 1958), konnte durch die Anwendung von Mischkulturen mit Alcaligenes spec. (Achromobacter metalcaligenes HIH 661/60) (MANNHEIM, 1966) in einfachen Pepton-Wasser-Medien überwunden werden.

Wie aus Tabelle III hervorgeht, erlauben die untersuchten biochemischen Reaktionen eine Aufteilung der Bakterien in mehrere Gruppen.

Fast alle untersuchten Stämme können Glucose unter anaeroben Bedingungen im stehenden Kulturröhrchen mit A. metalcaligenes säuern. H. aegyptius 180a Pittman und H. ducreyi greifen Glucose weder aerob noch anaerob an. Unter den Bedingungen, wie sie im OF-Medium nach HUGH & LEIFSON (1953) herrschen, vermögen H. parainfluenzae 429 Pittman, H. piscium und H. vaginalis Glucose nur oxydativ zu säuern.

Hinsichtlich der Säurebildung aus anderen Kohlenhydraten bzw. Zuckeralkoholen lassen sich innerhalb der Haemophilus-Gruppe mehrere Typen unterscheiden: So vermögen die Influenzae-Stämme und H. haemoglobinophilus Xylose anzugreifen, wogegen die "Para"-Stämme und H. aphrophilus nicht in der Lage sind, diesen Zucker zu spalten, wohl aber Saccharose, Maltose und Fructose verwerten. H. agni und H. vaginalis säuern neben der Xylose Fructose bzw. Maltose.

Eine weitere Gruppe mit H. aegyptius Leidy, den Somnus-Stämmen und H. ducreyi spalten neben der Glucose und Galactose (z.T.) keine anderen Zucker.

Allen gemeinsam ist die Fähigkeit Nitrat zu Nitrit zu reduzieren -Ausnahme: H. vaginalis- und das Unvermögen Rhamnose, Salizin, Aesculin, Adonit, Dulcit, Sorbit und Ammoniumcitrat zu verwerten, sowie Lysin zu decarboxylieren.

2. Cytochrom- und Chinongehalte unter aeroben Bedingungen bzw. Sauerstofflimitation

Die in Tabelle IV aufgeführten Cytochromgehalte zeigen, daß neben den Cytochromoxydase a_1 , a_2 und o , b - und c -typische Cytochrome vorkommen. Allen untersuchten Bakterien fehlt die Cytochromoxydase aa_3 . Sowohl bei Züchtung mit Sauerstoff als auch mit Fumarat als terminalem Elektronenakzeptor variieren die Gehalte erheblich. Allen untersuchten Stämmen gemeinsam ist der Besitz großer Mengen Cytochromoxydase o , -Ausnahme: die sauerstofflimitierten Influenzae-Stämme RAMC 18 Bensted und HIM 412-7, denen Cytochrome unter diesen Kulturbedingungen gänzlich fehlen-, und einer relativ großen Menge b - und c -typischer Cytochrome. Da sich die Differenzspektren beider Cytochrome teilweise überlagern, wurde darauf verzichtet, diese Cytochrome spektral genauer aufzutrennen. Jedoch ist bei den meisten Stämmen nach Züchtung unter sauerstofflimitierten Bedingungen eine Verschiebung des Summenmaximums zwischen 550-560 nm zum kurzwelligen Bereich zu erkennen.

Das vorherrschende Chinon der Bakterien ist Desmethylmenachinon (Tabelle V). Dieses kommt allein oder zusammen mit Ubichinon im größten Teil der untersuchten Stämme in variierenden Mengenverhältnissen vor. Dabei ist die Tendenz zu erkennen, daß unter sauerstofflimitierten Bedingungen Ubichinon vermindert und Desmethylmenachinon erhöht wird.

H. piscium, H. vaginalis und H. parainfluenzae 429 Pittman synthetisieren nur Ubichinon, H. parainfluenzae 429 Pittman zusätzlich ein noch nicht identifiziertes Chinon (Abb. 12). Diese Stämme werden auch bei sauerstofflimitierter bzw. anaerober Kultivierung nicht durch Fumarat gefördert, ein Charakteristikum aller übrigen hier untersuchten Naphthochinon enthaltenden Bakterien.

II. Der Kohlenhydratstoffwechsel einiger charakteristischer Vertreter der Gattung Haemophilus

Auf Grund der unterschiedlichen biochemischen Aktivitäten (Tabelle III) und des Chinongehalts (Tabelle IV) wurden vier Repräsentanten der Untergruppen ausgewählt und genauer hinsichtlich ihres Kohlenhydrat- und Energiestoffwechsels untersucht: H. influenzae RAMC 18 Bensted mit nur Desmethylmenachinon und fermentativen Glucoseabbau, H. parainfluenzae 1 Fleming mit Ubichinon und Desmethylmenachinon und fermentativem Glucoseabbau, H. parainfluenzae 429 Pittman mit Ubichinon, einem nicht-identifizierten Chinon und oxydativem Glucoseabbau und H. aegyptius 180a Pittman mit Desmethylmenachinon und dem Unvermögen, aus Glucose Säure zu bilden.

1. Der Einfluß verschiedener Substrate auf die Wachstumserträge

Die Verwendung schwach gepufferter, hochkomplexer Nährmedien zur Überprüfung der Wachstumsantworten auf die Zugabe verschiedener Kohlenhydrate, die sich in Form von unterschiedlichen Wachstumserträgen bemerkbar machen, läßt keine eindeutige Aussage zu, da viele Faktoren, besonders der Säuregrad, das Wachstum limitieren oder verstärken können.

Trotz dieser Einschränkung zeigte sich, daß Zusatz von Glucose oder Lactat unter aeroben Bedingungen eine Ertragssteigerung bewirkten (Tabelle VI), die außer bei H. aegyptius 180a Pittman für beide Substrate ziemlich gleich ist. Bei diesem Stamm beträgt der End-pH bei Kultivierung mit Glucose 5,8 gegenüber Lactatkulturen mit pH 7,0. Unter anaeroben Kulturbedingungen mit Fumarat als terminalem Elektronenakzeptor ist bei allen Stämmen die Förderung durch Glucose trotz sauren End-pH-Wertes am stärksten ausgeprägt.

2. Der zeitliche Ablauf des Glucose- und Lactatabbaus in Gegenwart unterschiedlicher terminaler Elektronenakzeptoren

Die Abbildungen 2a-d und 3a-d machen die Korrelation des Glucose- und Lactatabbaus mit der Zunahme der Bakterientrockenmasse deutlich.

Bei den Parainfluenzae-Stämmen und H.influenzae werden die dem Medium zugesetzten Kohlenhydrate bis zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase fast vollständig verbraucht. Unter anaeroben Kulturbedingungen mit Zusatz von Fumarat vermag H. parainfluenzae 1 Fleming Glucose sehr schnell umzusetzen, so daß am Ende der lag-Phase nurmehr wenig Glucose im Medium nachzuweisen ist. Das gleiche kann bei den Lactatkulturen beobachtet werden. Auch scheint sich bei den anderen Stämmen der Lactatabbau schneller zu vollziehen, da schon zu Beginn der exponentiellen Wachstumsphase etwa 50% des vorgegebenen Lactats aus dem Medium verschwunden sind.

H. aegyptius 180a Pittman, der unter den standardisierten Bedingungen der biochemischen Tests in Glucose-Pepton-Wasser-Medien keinen Umschlag des pH-Indikators bewirkt, verwertet bei der Kultivierung in Proteose-Pepton-Medium Glucose und Lactat, wenn auch zögernder als die anderen Haemophilus-Stämme.

3. Die Aktivität katabolisierender Enzymsysteme nach Auskunft der Atmungsraten

Der Sauerstoffverbrauch durch Bakterien nach Zugabe von Substraten ist ein Maß für die Aktivität der Enzymsysteme, die am Stoffwechsel dieser Substrate beteiligt sind. Die Anwendung verschiedener Substrate aus dem Kohlenhydratstoffwechsel, dem Citratcyclus und einiger anderer Stoffwechselwege zeigt (Tabelle VII), daß die untersuchten Bakterien in der Lage sind die Substrate der Glycolyse und des Citratcyclus, zwar in unterschiedlicher Geschwindigkeit, veratmen können. H. influenzae vermag

Fructose nicht abzubauen; H. aegyptius reagiert auf die Zugabe von 6-Phospho-Gluconat mit hohem Sauerstoffverbrauch. Unterschiede zeigen sich ebenfalls in der Veratmung der Aminosäuren Glutaminsäure, Asparaginsäure und Lysin, die von H. parainfluenzae 1 Fleming nicht verwertet werden.

Beim Vergleich aerober und anaerober Kulturen ergeben sich nur graduelle Unterschiede.

4. Die Aktivitäten der am Kohlenhydratkatabolismus beteiligten Enzyme

Die untersuchten Bakterienstämme verfügen über die Enzyme des Embden-Meyerhof-Parnas-, des Entner-Doudoroff-, des Pentose-Phosphat- Weges und des Citracycylus (Tabelle VIIId), wobei die Aktivitäten der einzelnen Enzyme sowohl vom Substrat als auch vom terminalen Elektronenakzeptor beeinflusst werden können. Neben den katabolisierenden Enzymen haben die Bakterienstämme die Enzymausstattung zur Gluconeogenese durch das Malat-Enzym und die Phosphoenolpyruvat-Carboxykinase.

Lactat-Dehydrogenasen unterschiedlicher Aktivitäten finden sich bei allen Stämmen. Die membrangebundene NADH-Fumarat-Reduktase, die im terminalen Elektronentransport Elektronen auf Fumarat überträgt, fehlt dem nur aerob kultivierbaren H. parainfluenzae 429 Pittman. Die sehr hohe Aktivität der Malat-Dehydrogenase, die ca. 100 bis 1 000 fach höher als die der anderen Enzyme ist, scheint ein charakterisierendes Merkmal der untersuchten Bakterien zu sein.

III. Der terminale Elektronentransport einiger Vertreter der Gattung Haemophilus

1. Die Löslichkeit von Cytochromen und Chinonen

In den Tabellen IX a-c sind die Ergebnisse der Versuche über die Löslichkeit der Atmungskettenbestandteile wiedergegeben.

Es wurden die NADH-Oxydase-Aktivität und der Chinon- und Cytochromgehalt sowohl in beschallten Bakterien-suspensionen als auch nach Ultrazentrifugation im Überstand und Sediment gemessen.

In allen Fällen zeigt die NADH-Oxydase-Aktivität im Sediment, verglichen mit den anderen Präparationen an, daß der Elektronentransport vom Niveau der Dehydrogenasen bis zum Sauerstoff in der Membranfraktion lokalisiert ist. Ebenso sind im Überstand keine Chinone wiederzufinden. Die Erhöhung des Chinongehaltes im Sediment liegt an der relativen Verringerung des Proteingehaltes, bezogen auf die beschallte Bakteriensuspension.

Bei den untersuchten Parainfluenzae-Stämmen konnte eine Auftrennung des Maximums zwischen 550 und 560 nm in der beschallten Bakteriensuspension und im Ultrazentrifugat gemacht, und der Gehalt an b- und c-typischen Cytochromen bestimmt werden. Dadurch wurde eine Verringerung des Cytochrom-c-Gehaltes relativ zum Cytochrom-b-Gehalt im Ultrazentrifugat ermittelt.

Der Quotient aus der NADH-Oxydase-Aktivität und dem Cytochrom-c-Gehalt zeigt, daß sich im Überstand ein für den Elektronentransport unwirksamer Cytochrom-c-Anteil angereichert hat bzw. daß sich der aktive Teil der Atmungskette im Sediment befindet und somit membrangebunden ist.

2. Cytochrom- und Chinongehalte nach Kultivierung mit verschiedenen Substraten

Die Kultivierung von H. influenzae und H. parainfluenzae 1 Fleming mit Glucose, Lactat, Succinat oder ohne Supplementierung läßt qualitativ keine Veränderung der Cytochrome erkennen (Tabelle X). Neben b- und c-typischen Cytochromen kommen die Cytochromoxydasen a_1 , a_2 und o vor. Die Mengenverhältnisse der Cytochrome nach Kultivierung mit diesen Substraten schwanken allerdings. Unterschiede wurden besonders zwischen aerober und anaerober Kultivierung deutlich. Nach anaerober Kultivierung weist die Verschiebung des Summenpeaks der α -Maxima von 558 auf 552 nm auf eine relative Zunahme c-typischer Cytochrome hin. Ebenso enthalten anaerob kultivierte Zellen regelmäßig mehr Cytochrom o als unter aeroben Bedingungen gewachsene.

H. parainfluenzae 429 Pittman synthetisiert die Cytochromoxydasen a_1 , a_2 und o neben den Cytochromen b/c. Die Züchtung von H. influenzae und H. parainfluenzae 1 Fleming in Proteose-Pepton-Medium mit Zusatz von Formiat ergibt nicht die bei den anderen Substraten beobachtete Verschiebung des dem c- bzw. b-typischen Cytochromen zuzuordnenden Maximums unter anaeroben Bedingungen. Es erscheint unter aeroben und anaeroben Kulturbedingungen bei der differenzspektrophotometrischen Analyse der Cytochrome lediglich ein Maximum bei 552 nm.

Für H. parainfluenzae 429 Pittman scheint Formiat in der Konzentration, die bei den anderen Bakterien einen Einfluß auf die Cytochrommenge hat, wachstumshemmend zu sein. Eine Beeinflussung der Menge der Chinone dieser Stämme läßt sich nur bei aerober mit Formiat oder ohne besonderes Substrat erkennen. Unter diesen Bedingungen wird der Chinongehalt um eine beträchtliche Menge verringert.

Bei H. parainfluenzae 1 Fleming mit zwei Chinonen wird unter anaeroben Bedingungen der Ubichinongehalt verringert und der Desmethylmenachinongehalt erhöht.

3. Tieftemperaturdifferenzspektren der Cytochrome nach aerober und anaerober Kultivierung

Die in flüssigem Stickstoff ausgeführten Differenzspektren bestätigen, daß die untersuchten Bakterien b- und c-typische Cytochrome enthalten (Abb.4-6).

Nach aerober Kultivierung ist im Differenzspektrum (Dithionit red. minus H_2O_2 ox.) neben dem Maximum bei 552 nm eine Schulter bei 558 nm ausgeprägt, was auf die Anwesenheit von b-typischen Cytochromen hindeutet. Das Verhältnis von c- und b-typischen Cytochromen beträgt etwa 1:1. Nach anaerober Kultivierung mit Fumarat als terminalem Elektronenakzeptor vergrößert sich das Mengenverhältnis dieser beiden Cytochrome. Während bei H. influenzae nur noch ein Maximum bei 550 nm ausgeprägt und zum langwelligen Bereich auch keine Schulter zu erkennen ist, kann man bei H. parainfluenzae 1 Fleming ein Maximum bei 550 nm, eine Schulter bei 553 nm und eine weitere Schulter bei 558 nm beobachten. Die Schulter bei 558 nm muß einem b-typischen Cytochrom zugeordnet werden. Jedoch beträgt das Mengenverhältnis Cytochrom c : Cytochrom b etwa 3:1.

4. Der Einfluß verschiedener Substrate auf die Aktivität des terminalen Elektronentransports

Die Tabelle XI zeigt die NADH-Oxydase- und NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität nach Kultivierung mit verschiedenen Substraten unter aeroben und anaeroben Bedingungen.

Die Aktivität des Elektronentransports bei H. influenzae wird bei aerober Kultivierung besonders durch Formiat und NADH gefördert. NADH allerdings beeinflusst nur die NADH-Oxydase; bei Kultivierung in Gegenwart von Formiat erhöht sich die NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität auf etwa das Doppelte des in der formiatfreien Kontrolle erreichten Wertes.

Unter anaeroben Bedingungen schwanken die Werte der NADH-Oxydase-Aktivität um 100 $\mu\text{mol NADH} / \text{min} \cdot \text{g Protein}$, während die Werte der NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivi-

tät im Bereich von 60 bis 125 $\mu\text{mol NADH/ min.gProtein}$ streuen.

Bei H. parainfluenzae 1 Fleming wird ebenfalls die NADH-Oxydase-Aktivität durch NADH und Formiat verändert. Anaerobe Kulturen zeigen die gleichen Tendenzen wie die von H. influenzae, mit Ausnahme der Succinat-Kultur, die extrem niedrige NADH-Oxydase- und NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivitäten aufweisen.

Der aerobe Elektronentransport bei H. parainfluenzae 429 Pittman ist intensiver als bei den anderen getesteten Stämmen. Hier fördert besonders die Supplementierung mit Glucose die NADH-Oxydase, die unter gleichen Bedingungen bei den anderen Stämmen sehr niedrig ist. H. parainfluenzae 429 Pittman ist nicht in der Lage, Fumarat als terminalen Elektronenakzeptor zu verwenden.

5. Der Einfluß verschiedener terminaler Elektronenakzeptoren auf die Wachstumserträge

Die Beeinflussung der Wachstumserträge durch die terminalen Elektronenakzeptoren ist deutlich ausgeprägt (Abb. 7 a-c).

Die höchsten Erträge werden bei mittlerer Schüttelfrequenz und somit mäßiger Belüftung erzielt, während unter anaeroben Kulturbedingungen ohne zusätzlichen Elektronenakzeptor die Erträge nur etwa 1/10 von denen belüfteter Kultur betragen. Fumarat als terminaler Akzeptor allerdings hat unter anaeroben Bedingungen eine steigernde Wirkung gegenüber un-supplementierten Kulturen.

Die unterschiedlichen Erträge sind sicherlich ein Maß für die durch die verschiedenen Potentialdifferenzen Wasserstoff-Sauerstoff bzw. Wasserstoff-Fumarat freigesetzte Energie.

6. Der Einfluß unterschiedlicher Hämatinkonzentrationen auf Ertrag, Atmungsaktivität, Cytochrom- und Chinongehalt bei H. influenzae

Die Ergebnisse solcher Untersuchungen sind in Abbildung 8 dargestellt.

H. influenzae zeigt eine Abhängigkeit des Wachstums von der Menge des im Medium angebotenen Hämatin, und zwar bis zu einer Hämatinkonzentration von $0,75 \mu\text{mol}$ pro ml Medium. Bei Überschreiten dieser Konzentration kann ein höherer Wachstumsertrag nicht mehr erzielt werden. Geringe Erträge ($0,025 \text{ mg BTrS/ml}$) sind noch bei Konzentrationen von $1,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$ Hämatin pro ml Medium zu erreichen.

Unabhängig von der angebotenen Hämatinmenge verhält sich das Desmethylmenachinon, das sowohl bei der niedrigen als auch bei der hohen Hämatinkonzentration etwa $1,55 \mu\text{mol/g Protein}$ beträgt.

Die Atmung sowohl mit Sauerstoff als auch mit Fumarat wird ebenso wie die Menge des Cytochrom b vom Hämatin beeinflusst. Erhöhungen der Hämatinkonzentration hat eine Erhöhung der Atmungsaktivität und des Cytochromgehaltes zur Folge, sogar noch bei solchen Konzentrationen, bei denen keine Erhöhung der Wachstumserträge mehr zu erzielen sind.

In den niedrigen Konzentrationen korrelieren Atmung und Erträge; im Gegensatz zum Cytochromgehalt, der schon bei $1,5 \cdot 10^{-2} \mu\text{mol}$ Hämatin pro ml Medium unter einen meßbaren Wert absinkt. Die Atmung dagegen ist bei $1,5 \cdot 10^{-3} \mu\text{mol}$ Hämatin pro ml Medium immer noch, wenn auch gering, nachzuweisen.

7. Die Hemmung des terminalen Elektronentransports durch verschiedene spezifische Hemmstoffe

a) Die Wirkung von Hemmstoffen auf die Veratmung von Substraten

Die Wirkung der Hemmstoffe Rotenon, HQNO, KCN, Malonat und TTA ist bei den untersuchten Bakterien prinzipiell gleich (Tab.XII a-c). Lediglich das Ausmaß

der Hemmung wird in einem kleinen Bereich unterschiedlich beeinflusst.

Die Veratmung von NADH und Lactat wird durch Rotenon, HQNO, KCN und TTA gehemmt, wohingegen Malonat nur einen Einfluß auf die Veratmung von Succinat zeigt.

Zwischen aeroben und anaeroben Kulturen sind keine Unterschiede bezüglich der Atmungshemmung festzustellen.

b) Hemmung der Fumaratatmung durch verschiedene Hemmstoffe

Die in den Tabellen XII a und b wiedergegebenen Daten lassen eine Hemmung der Fumaratatmung, wie sie als NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität bei 366 nm gemessen wird, durch Rotenon und HQNO erkennen. Schon geringe Mengen von HQNO hemmen die Aktivität fast vollständig. Dagegen haben KCN und Malonat auch in gleichen oder stärkeren Konzentrationen, verglichen mit der Atmungshemmung mit verschiedenen Substraten, kaum einen Einfluß auf die NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität.

Diese Aussagen gelten nur für H. influenzae und H. parainfluenzae 1 Fleming, da H. parainfluenzae 429 Pittman unter diesen Bedingungen keine Fumaratatmung aufweist.

8. Die Reduzierbarkeit der Cytochrome durch Substrate

Eine Beteiligung der Cytochrome bei der Veratmung von Substraten mit Sauerstoff oder anderen terminalen Akzeptoren kann dadurch untersucht werden, daß man differenzspektrophotometrisch die Redoxantwort der Cytochrome nach Zugabe von Substraten zu einer Bakterien-suspension und Übergang in den anaeroben Zustand (reduzierter Cytochromanteil) gegen einen durch ein Oxydationsmittel oxydierten Anteil entsprechender Bakteriensuspension mißt (Tab. XIV a-c, Abb. 9-11).

a) Die Cytochrome von H. influenzae RAMC 18 Bensted

Nach Zugabe von Substraten und Übergang in den anaeroben Zustand zeigt sich bei H. influenzae ein unterschiedlicher Reduktionsgrad von b- bzw. c-typischen Cyto-

chromen (Tab.XIV a,b). Betrachtet man den Reduktionsgrad der Cytochrome nach Zugabe von Dithionit als vollständig (100%), so werden unter aeroben Kulturbedingungen 80% durch Lactat und nur 49% durch Succinat reduziert. NADH bewirkt eine 99% Reduktion. Nach anaerober Kultivierung verändert sich die Reduzierbarkeit, verglichen mit aeroben Kulturen. Hierbei fällt besonders die Erhöhung des Reduktionsgrades durch Succinat (83%) auf, die dem Wert für die NADH-Reduktion entspricht.

Verwendet man Fumarat als Oxydationsmittel und Dithionit als Reduktionsmittel, so verschiebt sich das gemeinsame Maximum für b- und c-typische Cytochrome bei 557 nm um 3 nm in den kurzwelligen Bereich (Abb.9, Spektrum 2). Das Spektrum 3 (Abb. 9) zeigt den Fall, wo nach Zugabe von NADH und Übergang in den anaeroben Zustand in dieselbe Küvette zusätzlich Fumarat gegeben wurde und nach erneutem Übergang in den anaeroben Zustand das Differenzspektrum "NADH red.+Fumarat ox. minus H_2O_2 ox." geschrieben wurde. Dadurch wurden in der anaeroben Bakteriensuspension wieder diejenigen Cytochrome durch Fumarat oxydiert, die vorher durch NADH-Anaerobiose reduziert wurden. Diese Versuchsanordnung hat eine relative Zunahme der Extinktion bei 560 nm zur Folge, was auf eine Beteiligung b-typischer Cytochrome im anaeroben Elektronentransport auf Fumarat hinweist.

b) Die Cytochrome von H. parainfluenzae 1 Fleming

Die Reduktion der Cytochrome von H. parainfluenzae 1 Fleming durch Substrate ist stets weniger vollständig als die Reduktion durch Dithionit (Tab. XIV c,d). Unter aeroben Kulturbedingungen sind die prozentualen Reduktionswerte höher als unter anaeroben Kulturbedingungen. Dabei reduziert NADH den b/c-Cytochrom-Gehalt bei 556 nm nach aerober Kulturbedingung nur zu 88% im Gegensatz zu 57% unter anaeroben Bedingungen. Succinat reduziert zu 67% und Lactat zu 55% nach anaerober Kultivierung. Dabei ist allerdings zu berücksichtigen, daß das gemeinsame Maximum bei 552 nm liegt, gegenüber aeroben Kulturbedingungen, wo das Maximum nach 556 nm verschoben ist.

Bei der Verwendung von Fumarat als Oxydationsmittel und den Substraten als Reduktionsmittel findet sich ein Maximum bei 552 nm (aerob) bzw. 550 nm (anaerob). Die Versuchsanordnung "Substrat+Fumarat, anaerob minus H_2O_2 " verschiebt das Maximum in den langwelligen Bereich nach 560 nm (aerob) bzw. 554 nm (anaerob). Für NADH als Substrat ist dieses in Abbildung 10 dargestellt.

Reduktion mit Dithionit und Oxydation mit H_2O_2 ergibt im differenzspektrophotometrischen Bild ein Maximum bei 556 nm, 595 nm und 532 nm, die man b/c-typischen Cytochromen und den Cytochromoxydasen a_1 und a_2 zuordnen kann. Die gleichen Maxima ergeben sich auch bei der Versuchsanordnung "NADH, anaerob minus aerob". Durch Reduktion mit NADH und gleichzeitiger Zugabe von Fumarat zur Probenküvette und Oxydation durch H_2O_2 in der Referenzküvette kann eine Verschiebung des b/c-typischen Cytochrommaximums nach 560 nm beobachtet werden, wobei ebenfalls die Maxima für die Cytochromoxydasen a_1 und a_2 sichtbar werden (Abb. 10, Spektrum 2). Im Gegensatz dazu ergibt die Reduktion mit NADH und Oxydation mit Fumarat eine Verschiebung nach 552 nm, wobei die Maxima im langwelligen Bereich verschwinden (Abb. 10, Spektrum 3). Ein ähnliches Spektrum erhält man bei der Versuchsanordnung "Dithionit minus Fumarat" (Abb. 10, Spektrum 5).

c) Die Cytochrome von H. parainfluenzae 429 Pittman

Bei H. parainfluenzae 429 Pittman ist eine Reduktion der b-typischen Cytochrome durch die Substrate besonders für Lactat zu beobachten (94%) gegenüber der durch NADH und Succinat (je 71%) (Tab. XIVd). Das Maximum für diese Cytochrome liegt bei 556 nm. Reduktion mit Dithionit, wobei alle, auch nicht funktionelle Cytochrome erfaßt werden, führt zu einer Verschiebung des Maximums nach 554 nm. Weitere Maxima sind bei ca. 595 nm und 629 nm (Abb. 11).

Bei allen untersuchten Haemophilus-Stämmen ist eine Reduktion der Cytochrome durch die Substrate NADH, Succinat oder Lactat bei gleichzeitigem Übergang in den anaeroben Zustand möglich, wobei die b/c-typischen Cytochrome in unterschiedlichem Maß beteiligt sind. Eine Oxydation der Cytochrome durch Fumarat dagegen kann nur bei den Bakterien erfolgen, die Desmethylmenachinon allein oder zusammen mit Ubichinon enthalten. Dabei werden die c-typischen Cytochrome in stärkerem Ausmaß reduziert als die b-typischen, was auf einen möglichen Elektronentransport über Desmethylmenachinon, c-typische Cytochrome auf Fumarat hindeutet.

Diese Befunde werden weiterhin durch die quantitativen Untersuchungen der Cytochrome unterstützt, wobei eine relative Zunahme c-typischer Cytochrome nach anaerober Kultivierung mit Fumarat verglichen mit denen aerober Kulturen erfolgt.

9. Die Beteiligung der Chinone am terminalen Elektronentransport

Extraktion der Chinone durch Pentan und anschließende Reinkorporation derselben oder entsprechender Chinonevermag Auskunft über die Beteiligung am terminalen Elektronentransport zu geben, je nachdem welche Funktionen durch die Extraktion stillgelegt oder durch die Zugabe von Chinonen wiederhergestellt werden (Tab. XV a-c).

Die Trennung der Membranpartikel vom Cytoplasma hat durch Ultrazentrifugation eine erhöhte spezifische Aktivität zur Folge, da durch die Präparation der Proteingehalt relativ abnimmt. Anschließende Lyophilisation bewirkt dagegen einen Verlust der Aktivität. Die Aktivitätswerte dieses Präparations-schrittes dienen als Kontrolle für erfolgreiche Extraktion und anschließende Reinkorporation.

a) Die Abhängigkeit des Elektronentransports von den Chinonen bei H. influenzae RAMC 18 Bensted

Aerobe Kultivierung (Tab.XV a): Extraktion der lyophilisierten Partikel mit Pentan hat eine Abnahme der NADH-Oxydase-Aktivität um 93% und der NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität um 92% zur Folge. Entsprechende Ergebnisse sind bei der Veratmung verschiedener Substrate mit Sauerstoff zu beobachten. Durch die Zugabe von Ubichinon, das nicht in den intakten Bakterien nachzuweisen ist, erhöht sich die NADH-Oxydase-Aktivität auf 92%. Die Veratmung von NADH, Lactat und Succinat wird sogar mit über 100% wiederhergestellt.

Die Reinkorporation von Desmethylmenachinon, das einzige natürlich vorhandene Chinon, erhöht alle geprüften Aktivitäten um einen beträchtlichen Wert, NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität und Veratmung von NADH, Lactat und Succinat auch über 100%. Ferner wird das in den Bakterien fehlende Menachinon als respiratorisches Chinon in die Atmungskette eingebaut und erlaubt einen Elektronentransport auf Sauerstoff, stärker aber auf Fumarat. Die Kombination von Ubichinon und Desmethylmenachinon erbringt das gleiche Ergebnis: Erhöhung der NADH-Oxydase-Aktivität auf 102%, der NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität auf 88%, verglichen mit lyophilisierten Partikeln.

Anaerobe Kultivierung (Tab.XV a): Die Extraktion und Reinkorporation der Membranpartikel nach anaerober Kultivierung mit Fumarat als terminalem Akzeptor erbringt prinzipiell die gleichen Ergebnisse wie nach aerober Kultivierung. Jedoch ist die Wiederherstellung der NADH-Fumarat-Reduktase durch Desmethylmenachinon oder Ubichinon und Desmethylmenachinon stärker ausgeprägt. Auch konnte die Veratmung von Lactat nach Reinkorporation von Ubichinon und die von Succinat nach Reinkorporation von Desmethylmenachinon erheblich erhöht werden. Die NADH-Oxydase war bei beiden Kulturbedingungen nach Reinkorporation der Chinone durch HQNO hemmbar.

Als Kontrolle für den Grad der Chinonextraktion diene zusätzlich zu den Aktivitätsmessungen die aus dem durch pentanbehandelten Partikeln noch durch Anwendung von Methanol-Petroläther zu extrahierenden Chinone, die jeweils bis auf 10% (aerob) und 4% (anaerob) verringert waren.

b) Die Abhängigkeit des Elektronentransports von den Chinonen bei H. parainfluenzae 1 Fleming

Bei der Extraktion und Reinkorporation der Chinone von H. parainfluenzae 1 Fleming sind ähnliche Ergebnisse zu verzeichnen wie bei H. influenzae RAMC 18 Bensted. Extraktion der Chinone führt zum Verlust der Aktivitäten auf ca. 10% bis 20%, verglichen mit denen der lyophilisierten Partikel. Reinkorporation von Ubichinon vermag die NADH-Fumarat Reduktase-Aktivität nur zu 29% wiederherzustellen, gegenüber der NADH-Oxydase-Aktivität zu ca. 50% (aerobe Kultivierung). Dagegen führt die Reinkorporation von Desmethylmenachinon zu einer Erhöhung auf ca. 52% (NADH-Oxydase) bzw. 73% (NADH-Fumarat-Reduktase) und einer Veratmung von Succinat, Lactat und NADH. Ähnliche Ergebnisse sind auch bei gleichzeitiger Zugabe von Ubichinon und Desmethylmenachinon und bei Zugabe des in H. parainfluenzae 1 Fleming nicht nachzuweisenden Menachinons erzielt. Bakterienpräparationen aus anaerober Kultivierung verhalten sich ebenso, jedoch sind die Aktivitäten nach Reinkorporation beträchtlich höher als die nach aerober Kultivierung.

Nach Reinkorporation der Chinone war der Elektronentransport ebenfalls durch HQNO hemmbar.

c) Die Abhängigkeit des Elektronentransports von den Chinonen bei H. parainfluenzae 429 Pittman

Tabelle XV c zeigt die Ergebnisse der Extraktions- und Reinkorporationsversuche an H. parainfluenzae 429 Pittman. Wegen des fehlenden anaeroben Wachstums konnte nur eine aerobe Bakterienpräparation unter-

sucht werden, die lediglich eine Atmung mit Sauerstoff aufweist.

Diese Aktivitäten sind verglichen mit denen anderer Bakterien um fast das Doppelte höher. Bemerkenswert ist die geringe Succinatatmung.

Extraktion der Chinone führt zum Verlust der NADH-Oxydase-Aktivität um 85%.

Neben dem Ubichinon besitzen diese Bakterien ein Chinon, welches bisher nicht identifiziert werden konnte. Dieses Chinon ist auf Grund seines spektralen Verhaltens den bekannten Chinonen ziemlich unähnlich (vgl. Abb. 20), muß aber doch wohl zu den Naphthochinonen gerechnet werden.

Extraktion und anschließende Reinkorporation von Ubichinon stellt die respiratorischen Aktivitäten auf Sauerstoff zu einem hohen Anteil wieder her. Ein ähnliches Ergebnis wurde auch mit den in intakten Bakterien dieses Stammes nicht nachgewiesenen Naphthochinonen, Menachinon oder Desmethylmenachinon, erreicht; ferner wurde sogar eine NADH-Fumarat-Reduktase stimuliert, die in den beschallten Bakterien, den Partikeln oder den lyophilisierten Partikeln nicht nachzuweisen ist.

Kombinationen von Ubichinon mit den Naphthochinonen führte zu gleichen Ergebnissen.

Die Extraktions-Reinkorporationsversuche zeigen insgesamt, daß der terminale Elektronentransport bei den untersuchten Haemophilus-Stämmen von den Chinonen abhängig ist.

Desmethylmenachinon einerseits ist am aeroben und anaeroben Elektronentransport mit Fumarat beteiligt und kann bei H. parainfluenzae 429 Pittman eine in den intakten nicht nachzuweisende Fumaratatmung aktivieren. Eine Reaktivierung des Elektronentransports durch dieses Naphthochinon erlaubt weiterhin eine Veratmung von Succinat, was durch Menachinon wegen des niedrigeren Redoxpotentials nicht möglich ist (KRÜGER & DADAK, 1969). Ubichinon andererseits ermöglicht bei H. influenzae RAMC 18 Bensted einen aeroben Elektronentransport, obwohl bei diesem Stamm Ubichinon natürlich nicht vorkommt.

Diskussion

I. Der Kohlenhydratkatabolismus einiger Vertreter der Haemophilus-Gruppe

1. Wachstumsverhalten und Kohlenhydratabbau

Eine Untersuchung der metabolischen Fähigkeiten dieser Bakterien ist wegen hoher Ansprüche an das Kulturmedium problematisch, da eine Kultivierung in einfachen definierten Medien nicht möglich ist. Zudem kommt noch die Unfähigkeit Porphyrine und/oder Pyridinnucleotide aus einfachen Bausteinen zu synthetisieren.

Die Untersuchungen von WHITE (1966) an Haemophilus parainfluenzae Bossy No 7 Leidy zeigten, daß dieser Stamm über die Enzyme des Pentose-Phosphatweges, der Glykolyse und des Citratcyclus verfügt, und daß die Aktivität dieser Enzyme ausreicht, den Energiehaushalt aufrechtzuerhalten und eine entsprechende Bakterienmasse zu produzieren. Jedoch ist H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy insofern "untypisch" für die Vertreter dieser Gruppe, als weitaus höhere Wachstumserträge als bei vielen anderen bekannten Stämmen dieser Gattung erzielt werden (unveröff. Beobachtung). Dieses wird auch durch den schnellen Abbau von Glucose (WHITE, 1966) verglichen mit den hier untersuchten Stämmen demonstriert. Ein Vergleich der Wachstumserträge der untersuchten Stämme ist insofern mit Schwierigkeiten verbunden, als ihre Höhe sicherlich von der Säurebildung limitiert wird. Da jedoch der pH-Wert bei einem Stamm nach Kultivierung mit den verschiedenen Substraten gleich ist, bietet sich hier die Möglichkeit, die Ertragssteigerung mit Glucose oder Lactat im Gegensatz zu dem Ertrag ohne besondere Kohlenstoffquelle zu unterscheiden. Glucose oder Lactat fördert in jedem Fall in aeroben und anaeroben Kulturen das Wachstum. Das gilt auch für H. aegyptius, der nach dem standardisierten differentialdiagnostischen Test "Säurebildung aus Glucose" nicht in der Lage ist, in Gegenwart von Glucose soviel saure Spaltprodukte zu akkumulieren, daß

ein pH-Umschlag des Peptonwassermediums eintritt (Tab. III). Dieses zeigt, daß H. aegyptius zur Säureproduktion nur in hochkomplexen Medien in der Lage ist, was der pH-Wert 5,8 verdeutlicht, daß dagegen das einfache Peptonwassermedium, in dem die biochemischen Leistungen getestet werden, und in dem H. aegyptius nach Zusatz von NAD und Haemin sehr wohl wachsen kann, nicht zu einer Säureproduktion aus Glucose befähigt.

Das Unvermögen von H. parainfluenzae 429 Pittman unter anaeroben Bedingungen zu wachsen, steht in direktem Zusammenhang mit dem Fehlen von Naphthochinonen, die, wie die Extraktions- und Reinkorporationsversuche sowohl an den Haemophilus-Spezies als auch an Bacillus megaterium und Proteus rettgeri (KRÖGER & DADAK, 1969; KRÖGER et al., 1971) zeigen, für einen anaeroben Elektronentransport auf Fumarat notwendig sind. Daneben fehlt allerdings auch ein fermentativer Stoffwechselweg, was H. parainfluenzae 429 Pittman als ein strikt aerobes Bakterium erscheinen läßt.

2. Die Enzymsysteme des Kohlenhydratstoffwechsels

Die Ertragssteigerung mit Glucose oder Lactat und der Abbau dieser Kohlenhydrate zeigt intakte Abbauwege für diese Substrate an, die jedoch verglichen mit H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy (WHITE, 1966) und anderen Bakterienstämmen (HANSON & COX, 1967) weitaus geringere Umsatzraten aufweisen. Das Vorhandensein solcher Enzymketten wird durch die Aktivitäten der Enzyme selbst und durch den Sauerstoffverbrauch nach Zugabe entsprechender Substrate demonstriert. Diese Versuche zeigen, daß die Bakterien neben dem Embden-Meyerhof-Parnas- auch über einen Pentose-Phosphat- und einen Entner-Doudoroff-Weg verfügen. Der Entner-Doudoroff- oder KDPG-Weg konnte bei einer Reihe gram-negativer Bakterien nachgewiesen werden (KERSTERS & DE LEY, 1968).

Weiterhin verfügen die Haemophilus-Stämme über die Enzyme des Citratcyclus, die jedoch sehr geringe Aktivitäten aufweisen, mit Ausnahme der Malat-Dehydrogenase, deren sehr hohe Aktivität ein gemeinsames Merkmal der untersuchten Stämme ist. Diese extrem hohe Aktivität läßt auf einen verkürzten Citratcyclus schließen, wie er in der Art eines Dicarbonsäurecyclus bei einigen Bakterien vermutet wird (cf. KRAMPITZ, 1961). Jedoch würde das eine entsprechend hohe Aktivität der Nachbarenzyme voraussetzen, was bei den untersuchten Stämmen nicht der Fall ist. Auch WHITE (1966) fand bei H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy eine hohe Malat-Dehydrogenase-Aktivität, die aber verglichen mit anderen Enzymen z.B. der Glykolyse nicht besonders hervorsticht.

Die Bedeutung eines derartigen Befundes ist nicht zu ermessen, solange bei den Bakterien dieser Gruppe andere Stoffwechselwege, die eine mögliche Schlüsselfunktion der Malat-Dehydrogenase erklären könnten, nicht untersucht sind.

Bei der Kultivierung mit Glucose oder Lactat kann man unter anaeroben Kulturbedingungen eine Repression der Enzyme des Citratcyclus beobachten, wie sie von anderen Bakterien bekannt ist (ENGLESBERG et al., 1954; GRAY et al., 1966a, 1966b). Da bei fehlendem terminalem Elektronenakzeptor der Energiehaushalt lediglich über Substratkettenphosphorylierung aufrechterhalten wird, fällt eine Beteiligung der Enzyme des Citratcyclus zur Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten fort, da rückkoppelnd NADH-Oxydase und Succinat-Dehydrogenase bei Übergang in den anaeroben Zustand verschwinden (THOMAS et al., 1972).

Bei der Kultivierung mit Fumarat als terminalem Akzeptor wird bei den hier untersuchten Stämmen diese Repression nicht so deutlich wie bei den Untersuchungen von ENGLESBERG et al. und GRAY et al., da noch ein Elektronentransport auf Fumarat stattfinden kann.

Jedoch ist die terminale Fumarat-Reduktase-Aktivität weit geringer als die der Oxydase. Die NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität, die trotz Kultivierung ohne diesen Akzeptor zu beobachten ist, hat seine mögliche Ur-

sache in der Bereitstellung von Fumarat aus dem Gesamtstoffwechsel, das dann als Akzeptor dienen kann. Eine Repression der Aktivitäten der Enzyme des Citratcyclus, wie sie bei Staphylococcus aureus bei Kultivierung mit Glucose in komplexen Medien erfolgt (COLLINS & LASCELLES, 1962; STRASTERS & WINKLER, 1963), ist bei den haemophilen Bakterien nicht zu beobachten.

II. Der terminale Elektronentransport von Vertretern der Haemophilus-Gruppe

1. Der Einfluß des Substrats auf die Atmungskettenbestandteile

a) Die Art und Menge von Chinonen und Cytochromen

Über den Einfluß von Substraten auf die Zusammensetzung der Atmungskette bei Bakterien sind widersprüchliche Ergebnisse bekannt geworden, wobei allerdings nur die Wirkung von Glucose untersucht wurde (COLLINS & LASCELLES, 1962; STRASTERS & WINKLER, 1963; WHITE, 1967). COLLINS & LASCELLES fanden, daß Glucose als Zusatz zu einem komplexen Medium bei Staphylococcus aureus eine Repression der Cytochrome um 40% bewirkt; zu ähnlichen Ergebnissen kamen STRASTERS & WINKLER. WHITE dagegen zeigte an H. parainfluenzae Bossy No 7, daß der Glucoseabbau zwar einen Einfluß auf die membrangebundenen Dehydrogenasen hat, die Bildung der anderen Komponenten des terminalen Elektronentransports aber unbeeinflusst bleibt. Die hinsichtlich solcher Phänomene untersuchten Haemophilus-Stämme stellen zumindest nach aerober Kultivierung drei Typen dar: Bei H. influenzae RAMC 18 Bensted wird die Cytochromsynthese durch die Substrate induziert; bei H. parainfluenzae 1 Fleming ist eine Induktion oder Repression nicht eindeutig nachzuweisen; H. parainfluenzae 429 Pittman dagegen wird in der Cytochromsynthese gefördert.

Hinsichtlich der Aktivierung der Chinonsynthese durch Substrate in komplexen Medien sind keine Daten bekannt. Der Vergleich des Chinongehalts in definierten Medien (Glucose, Pyruvat, Citrat, Succinat, Fumarat, Malat, Glutamat) mit einem Glycerol-1-P-Medium oder komple-

zen Medium ohne besondere Kohlenstoffquelle von Proteus rettgeri ergab, daß der Ubichinongehalt in definierten und komplexen Medien gleich ist, in Glycerol-1-P-Medium dagegen geringer war. Der Menachinongehalt dagegen war im definierten und Minimalmedium gleich, im komplexen Medium dagegen erhöht (KRÖGER et al., 1971). Bei H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy wird der Desmethylmenachinongehalt durch Glucose nicht beeinflusst (WHITE, 1967). Die Chinonsynthese der haemophilen Bakterien wird durch die meisten der Substrate gefördert, z.T. bis zum vierfachen.

Der regulierende Einfluß der Substrate sowohl auf die Cytochrome als auch auf die Chinonsynthese ist bisher nicht verstanden. Sicherlich werden die Dehydrogenasen, auch die membrangebundenen durch Metaboliten beeinflusst, was an vielen Beispielen bekannt wurde (cf. ATKINSON, 1969; ORNSTON, 1971). Möglicherweise wirken daher die Substrate über die membrangebundenen Dehydrogenasen auf Kontrollmechanismen der Cytochrom- und Chinonsynthese.

Ein direkter Einfluß auf die qualitative und quantitative Zusammensetzung ist bei der Anwendung unterschiedlicher terminaler Elektronenakzeptoren bekannt. Sauerstoff induziert einerseits bei Pasteurella pestis, Bacillus cereus und Salmonella typhimurium die Synthese des Elektronentransportsystems (ENGLEBERG et al., 1954 a,b; RICHMOND & MAALØE, 1962; SCHAEFFER, 1962), andererseits wird durch Sauerstoff bei Pseudomonaden und H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy die Cytochromsynthese reprimiert (LENOFF et al., 1956; ROSENBERGER & KOGUT, 1958; WHITE, 1962). Diese unterschiedlichen Aussagen sind schlecht miteinander vergleichbar, da verschiedene Sauerstoffpartialdrücke verwandt wurden, die unterschiedliche Effekte bewirkten. LASCELLES (1964), SINCLAIR & WHITE (1970) und FISCHER (1972) konnten zeigen, daß die Synthese von Cytochromen und auch von Chinonen nicht linear mit dem Ansteigen des Sauerstoffpartialdruckes einhergeht, sondern daß vielmehr hohe Partialdrücke die Cytochromsynthese reprimieren und kleinere sie

induzieren. Sehr kleine Drücke haben keinen Einfluß. Andere Elektronenakzeptoren als Sauerstoff oder Nitrat wie z. B. Fumarat verändern ebenfalls die Relation der Atmungskettenkomponenten (SINCLAIR & WHITE, 1970; KRÖGER & DADAK, 1969; KRÖGER et al., 1971). Einen Effekt des terminalen Akzeptors auf das Wachstumsverhalten, -Förderung des anaeroben Wachstums durch Fumarat-, ist bei den hier untersuchten Stämmen zu verzeichnen (Abb. 13-15).

Die Verschiebung des Cytochrommaximums bei 550-560 nm in den kurzwelligen Bereich, die nach anaerober Kultivierung mit Fumarat zu beobachten ist, könnte einmal seine Ursache darin haben, daß unter anaeroben Bedingungen mit Fumarat die Cytochromoxydase o, die als b-typisches Cytochrom im Bereich 555 bis 560 nm absorbiert, in geringeren Mengen synthetisiert wird und somit das Maximum des c-typischen Cytochroms überwiegt und eine Verschiebung nach 550 nm die Folge ist. Zum anderen kann die Verschiebung des Maximums auf einen funktionellen anaeroben Elektronentransport über c-typische Cytochrome auf Fumarat anzeigen. Die relativ geringfügige quantitative Veränderung des Cytochrom o-Gehaltes nach anaerober Kultivierung läßt eher die Deutung zu, daß der Elektronentransport auf Fumarat über die c-typischen Cytochrome verläuft. Bei Kultivierung von H. influenzae und H. parainfluenzae 1 Fleming mit Formiat ist die Verschiebung des b- bzw. c-typischen Maximums nicht zu erkennen. Sowohl unter aeroben als auch unter anaeroben Kulturbedingungen findet sich nur ein Maximum bei 552 nm. Dieser Befund deutet darauf hin, daß Formiat die Synthese b-typischer Cytochrome reprimiert und somit möglicherweise die vom Formiat stammenden Elektronen über c-typische Cytochrome zum Sauerstoff bzw. Fumarat fließen. WHITE (1964) fand auch bei H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy eine membrangebundene Formiat-Dehydrogenase.

Der Einfluß von terminalen Elektronenakzeptoren auf den Chinongehalt wird sowohl bei den drei näher untersuchten Haemophilus-Stämmen als auch bei den anderen Vertretern dieser Gattung deutlich. Kultivierung mit Sauerstoff erhöht den Ubichinongehalt, anaerobe Kultivierung mit Fumarat dagegen erniedrigt den Ubichinongehalt und erhöht den Desmethylmenachinonanteil. Ähnliche Befunde mit Ubichinon und Menachinon machten POLGLASE et al. (1966) an Escherichia coli und KRÖGER et al. (1971) an Proteus rettgeri. Bei P. rettgeri konnte der Schluß gezogen werden, daß Menachinon im anaeroben Elektronentransport auf Fumarat fungiert, Ubichinon aber nur an der aeroben Atmung beteiligt ist.

b) Die Aktivität des terminalen Elektronentransports

Bei der Messung der NADH-Oxydase und NADH-Fumarat-Reduktase, - hierbei handelt es sich um ein Enzymsystem-, ist es schwer, den Einfluß einer besonderen Kohlenstoffquelle in einem komplexen Medium zu deuten. Sicherlich werden durch das Substrat die membrangebundenen Dehydrogenasen aktiviert bzw. reprimiert, wie bei E. coli und H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy (GRAY et al., 1966 a,b; WHITE, 1964) demonstriert werden konnte. Möglicherweise haben aber auch die Kohlenstoffquellen direkte Beziehungen zur Synthese von Atmungskettenbestandteilen, wie schon im vorigen Kapitel erläutert wurde. KRÖGER et al. (1971) z.B. fanden, daß die Kultivierung von P. rettgeri im komplexen Medium sowohl eine erhöhte Aktivität des terminalen Elektronentransports als auch eine Vergrößerung des Cytochrom- und Chinongehalts zur Folge hat. Die Aufklärung solcher regulatorischer Mechanismen wird wohl insgesamt einer gesonderten und genauen Analyse bedürfen.

2. Die Lokalisation von Chinonen und Cytochromen

Das Aufbrechen von Bakterienzellen kann auf verschiedene Weise erfolgen, wobei die Desintegration durch

eine French-Press, durch Ultraschall oder durch Glasperlen in einem Homogenisator, oder osmotische Lyse von Sphäroplasten die häufigsten Methoden sind. Die nach Anwendung solcher Methoden entstehenden Membranpartikel verfügen noch in den meisten Fällen über eine vollständige Aktivität zum Elektronentransport (cf. SMITH, 1968).

In Übereinstimmung mit den Befunden, die an E.coli, H. parainfluenzae und P. rettgeri erhoben wurden (BISHOP & KING, 1962; WHITE, 1965; KRÖGER et al., 1971), ist im Überstand nach Ultrazentrifugation kein Chinon nachzuweisen. Die gesamten Chinone befinden sich in der Cytoplasmamembran der Zelle, wo sie in der Lipidschicht verankert sind (KRÖGER et al., 1971). SMITH & WHITE (1962) konnten ein lösliches c₁-typisches Cytochrom in H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy nachweisen, welches durch NADH oder Succinat nicht reduziert wird. Ähnliche Befunden erhoben TANIGUCHI & KAMEN (1965) und STRAAT & NASON (1965).

Die Ergebnisse, die an den hier untersuchten Spezies gewonnen wurden, weisen übereinstimmend auf einen löslichen c-typischen und einen membrangebundenen b-typischen Cytochromanteil hin, was durch das Verhältnis NADH-Oxydase-Aktivität zu Cytochrom-c-Gehalt (Tab. IX a-c) demonstriert wird. Möglicherweise entspricht das c-typische Cytochrom (Absorptionsmaximum bei 552 nm) dem von SMITH & WHITE aufgrund des spektralen Verhaltens als Cytochrom c₁ identifizierten Cytochroms (Absorptionsmaximum bei 553 nm).

3. Die Rolle der Chinone im terminalen Elektronentransport

Die Beteiligung von Chinonen im terminalen Elektronentransport von Bakterien ist an einigen Beispielen gut untersucht worden (Zusammenfassung bei KRÖGER & KLINGENBERG, 1970; MARQUEZ & BRODIE, 1970; KRÖGER et al., 1971; HATCHIKIAN, 1974; SCHWARTZ & SPORKENBACH, 1975).

a) Ubichinon

Ubichinon als einziges respiratorisches Chinon kommt in den chemo-organotrophen, aeroben, gram-negativen Eubacteriales und Pseudomonadales vor (BISHOP et al., 1962; WHISTANCE et al., 1969; CALLIES, 1973).

Aufgrund der Bestimmung des Redoxzustandes im steady state der Atmung konnte festgestellt werden, daß Ubichinon zwischen den Flavoproteinen und den Cytochromen fungiert (BENZIMAN & GOLDHAMER, 1968; SWANK & BURRIS, 1969). Die Rolle des Ubichinons im Elektronentransport von Azotobacter vinelandii wurde oben (S.8) referiert.

Das Zusammenspiel von Ubichinon und Menachinon wurde in der umfassenden Studie an P. rettgeri von KRÖGER et al. (1971) dargestellt.

In den untersuchten Haemophilus-Stämmen hat Ubichinon eine ähnliche Funktion wie bei A. vinelandii oder P. rettgeri. Wie die Extraktions- und Reinkor-porationsversuche zeigen (Tab. XV b,c) fungiert Ubichinon im aeroben Elektronentransport. Eine Beteiligung an der anaeroben Atmung mit Fumarat dagegen kann ausgeschlossen werden. Dafür spricht auch die fehlende Fumaratatmung von H. parainfluenzae 429 Pittman.

b) Desmethylmenachinon

Desmethylmenachinon wurde bisher nur bei Streptococcus faecalis, Haemophilus-Stämmen und wenigen Pasteurella- und Actinobacillus-Stämmen nachgewiesen (BAUM & DOLIN, 1963; LESTER et al., 1964; ZABEL, 1974; HOLLÄNDER & MANNHEIM, 1975). In diesen Bakterien kommt Desmethylmenachinon allein oder neben Ubichinon vor. WHISTANCE et al. (1969) berichteten, daß Desmethylmenachinon neben Ubichinon und Menachinon in E. coli nachzuweisen ist. Dieser Befund konnte allerdings in jüngster Zeit nicht bestätigt werden (BEERMANN, 1975).

Die Rolle des Desmethylmenachinons im Elektronentransport von H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy

wurde von WHITE (1965) untersucht. Er fand, daß dieses Chinon zwischen den Flavoproteinen und Cytochrom b plaziert ist und von den Substraten reduziert werden kann, die eine Sauerstoffatmung stimulieren. Jedoch ist einzuwenden, daß die Bestimmung des Reduktionsgrades von Naphthochinonen nach verschiedenen Extraktionsschritten wegen der wahrscheinlichen Autoxydation problematisch ist.

In den hier untersuchten Stämmen hat Desmethylmenachinon zwei Funktionen. Einmal verläuft die Sauerstoffatmung über dieses Chinon, zum anderen aber auch die anaerobe Fumaratatmung. Diese wird durch die verstärkte Desmethylmenachinonproduktion unter anaeroben Bedingungen mit Fumarat (Tab.V), durch die Förderung des anaeroben Wachstums durch Fumarat (Abb. 13-15) und durch die Extraktions- und Reinkorporationsversuche gezeigt. Eine solche Funktionsteilung der respiratorischen Chinone, besonders aber die Bedeutung eines Naphthochinons für die anaerobe Atmung waren bisher lediglich vom Menachinon bekannt (KRÜGER & DADAK, 1969; KRÜGER et al., 1971; HATCHIKIAN, 1974; SCHWARTZ & SPORKENBACH, 1975). KRÜGER (1974) konnte zeigen, daß bei P. rettgeri die anaerobe Atmung mit Fumarat mit der Synthese von ATP gekoppelt ist. Im Gegensatz aber zum Menachinon dürfte Desmethylmenachinon ein positiveres Redoxpotential besitzen, da in extrahierten Membranpartikeln durch eine Zugabe von Desmethylmenachinon die Veratmung von Succinat ermöglicht wird. Unter ähnlichen Bedingungen ist das mit Menachinon nicht möglich (KRÜGER et al., 1971).

4. Die Rolle der Cytochrome im terminalen Elektronentransport

Die umfassenden Untersuchungen der Cytochromfunktion in H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy durch WHITE und Mitarbeiter wurden schon im Einleitungskapitel III Dargestellt. Eine ähnliche dreidimensionale Anordnung der Atmungskettenbestandteile wurde bisher in keinem anderen Bakterienstamm nach-

gewiesen. Wohl erklärt die eingehende Studie des Elektronentransportsystems von P. rettgeri (KRÖGER et al., 1971), daß zwei b-typische Cytochrome im Elektronentransport fungieren, wobei ein bei der Oxydation von Formiat beteiligtes Cytochrom eine Rolle im anaeroben Elektronentransport auf Fumarat spielen kann. Eine Beteiligung von Cytochrom b im anaeroben Elektronentransport auf Fumarat wurde auch bei Desulfovibrio gigas (HATCHIKIAN & LE GALL, 1972; HATCHIKIAN, 1972) aufgrund von Hemmstoffversuchen postuliert.

Bei den untersuchten Haemophilus-Stämmen konnte eine Funktion der Cytochrome im terminalen Elektronentransport nachgewiesen werden. Neben der Beteiligung der Cytochromoxydasen a_1 , a_2 und o am aeroben Elektronentransport (Abb. 17-19) konnte die unterschiedliche Funktion der b- und c-typischen Cytochrome gezeigt werden. Dieses wird besonders bei H. parainfluenzae 1 Fleming deutlich. Durch die Oxydation der Atmungskettenbestandteile durch Fumarat lassen sich nur c-typische Cytochrome nachweisen. Das bedeutet, daß zum einen die b-typische Cytochromoxydase o nicht oxydiert wird, d.h. im herrschenden anaeroben Zustand reduziert bleibt und somit spektral nicht sichtbar wird, und daß zum anderen die b-typischen Cytochrome im anaeroben Elektronentransport auf Fumarat nicht beteiligt sind. In entsprechenden Experimenten ist eine Funktion der b-typischen Cytochrome im aeroben Elektronentransport dargestellt (Abb. 18, Kurve 2).

Die unterschiedlichen Funktionen der c- und b-typischen Cytochrome lassen sich auch an H. influenzae RAMC 18 Bensted zeigen; H. parainfluenzae 429 Pittman dagegen kann diesbezüglich wegen der fehlenden Fumaratatmung in ähnlicher Weise nicht untersucht werden.

Wie die Tieftemperaturspektren zeigen, verbergen sich im gemeinsamen Maximum zwischen 550 nm und 560 nm mehrere c- und b-typische Cytochrome.

Mit den angewandten spektroskopischen Methoden war es nicht möglich, eine genaue Funktionsanalyse dieser einzelnen Anteile zu untersuchen. Das kann bedeuten, daß in den Cytochrommaxima, die durch die unterschiedliche Reduktion oder Oxydation mit Substrat oder Dithionit bzw. H_2O_2 oder Fumarat, neben b-typischen Cytochromen noch c-typische zu finden sind und umgekehrt.

Falls die Redoxpotentiale von c-typischen Cytochromen und Desmethylmenachinon ähnlich sind, besteht auch die Möglichkeit, daß bei dem Elektronenstau, der durch die Anaerobie notwendigerweise entsteht, Elektronen über die Potentialdifferenz gehoben auf Fumarat fließen und somit eine Beteiligung von c-typischen Cytochromen vorgetäuscht wird. Ähnliche Verhältnisse wurden bei P. rettgeri zwischen einem mit einer Formiat-Dehydrogenase verknüpften Cytochrom b und Menachinon nachgewiesen (KRÜGER et al., 1971).

Diese Möglichkeit wird jedoch durch die Hemmbarkeit des anaeroben Elektronentransports auf Fumarat durch HQNO eingeschränkt, vorausgesetzt, daß HQNO zwischen b- und c-typischen Cytochromen aktiv ist (LIGHTBOWN & JACKSON, 1956; ASANO & BRODIE, 1965).

5. Die Atmungskette von H. parainfluenzae 1 Fleming

Das terminale Elektronentransportsystem von H. parainfluenzae 1 Fleming setzt sich aus Ubichinon, Desmethylmenachinon, den Cytochromoxydase a_1 , a_2 und o und b- und c-typischen Cytochromen zusammen.

Wie die Extraktions-Reinkorporationsversuche zeigen, sind Ubichinon und Desmethylmenachinon für einen Elektronentransport notwendig, wobei über Ubichinon Elektronen nur auf Sauerstoff, über Desmethylmenachinon Elektronen aber auf Sauerstoff und Fumarat übertragen werden. Diese Möglichkeit wird auch durch die unterschiedliche Chinonsynthese bei Kultivierung mit Sauerstoff oder Fumarat als terminale Elektronenakzeptoren unterstützt. Ebenso wie in E. coli (POLGLASE et al., 1966) und P. rettgeri (KRÜGER et al., 1971) wird unter aeroben Bedingungen hauptsächlich

Ubichinon, unter anaeroben Bedingungen mit Fumarat aber Desmethylmenachinon vermehrt synthetisiert. Die Desmethylmenachinonsynthese korreliert eng mit der NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität.

Ähnliche Verhältnisse sind bei P. rettgeri zu finden. Jedoch schließt das negative Redoxpotential von Menachinon eine Veratmung von Succinat aus, so daß Succinat nur über den "aeroben" Weg der Atmungskette über Ubichinon veratmet werden kann.

H. parainfluenzae dagegen kann Elektronen vom Succinat sowohl über Ubichinon als auch über Desmethylmenachinon transportieren, ebenso wie von NADH. Wegen der relativ hohen Atmungsaktivität bei Verwendung von Lactat als Substrat ist ebenso wie bei H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy (WHITE, 1964) eine membrangebundene Lactat-Dehydrogenase anzunehmen.

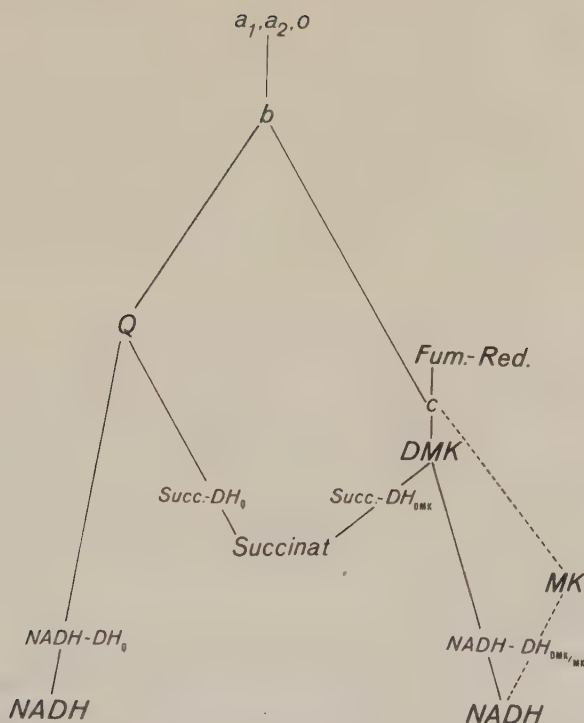
Die spezifische Hemmung der Atmung von Lactat durch Rotenon läßt aber vermuten, daß bei der Oxydation von Lactat Reduktionsäquivalente in Form von NADH entstehen, die dann über die Elektronentransportkette weiter oxydiert werden.

Rotenon hat nur einen Einfluß auf die Oxydation von NADH, wie Malonat nur die Succinatveratmung hemmt. Das bedeutet, daß Komplex I und Komplex II des Elektronentransports vorhanden sind. Die Veratmung von Succinat und NADH über Ubichinon und Desmethylmenachinon setzt bei unterschiedlichen Redoxpotential dieser Chinone verschiedene spezifische Dehydrogenasen voraus. Solche spezifischen NADH-Dehydrogenasen für Ubichinon und Menachinon wurden in E. coli durch BRAGG & HOU (1967) nachgewiesen und auch für P. rettgeri vermutet (KRÜGER et al., 1971). SINGER (1971) berichtet über das Vorkommen verschiedener Succinat-Dehydrogenasen, allerdings ohne den Hinweis auf besondere Spezifitäten, die aber durchaus denkbar sind. Die Reaktivierung des Elektronentransports sowohl auf Sauerstoff als auch auf Fumarat durch Menachinon läßt sich nur so erklären, daß die Spezifität der NADH-Dehydrogenase nicht von der fehlenden Methyl-

gruppe beim Desmethylmenachinon abhängig ist, und daß die Dehydrogenase in einem größeren Redoxbereich wirksam werden kann.

Die Hemmung des aeroben und des anaeroben Elektronentransportweges durch HQNO läßt auf die Beteiligung der Cytochrome im Elektronentransport schließen. Wie die Reduktions- und Oxydationsversuche zeigen, und wie schon oben (S.50) erläutert, haben die einzelnen Cytochrome unterschiedliche funktionelle Bedeutung.

C-typische Cytochrome sind am Fumaratweg und b-typische am Sauerstoffweg beteiligt. Weitere Hinweise liefern die Tieftemperaturspektren. Nach aerober Kultivierung überwiegen b-typische Cytochrome, verglichen mit denen nach anaerober Kultivierung mit Fumarat. Umgekehrt verhalten sich dagegen die c-typischen Cytochrome. Die Verbindung des anaeroben mit dem aeroben Weg geschieht zwischen den c-typischen und dem b-typischen Cytochromen (Abb. 18, Spektrum 4). Eine Beteiligung von Cytochromoxydasen am Elektronentransport auf Fumarat konnte durch die Reduktions- Oxydationsversuche und durch die fehlende Hemmung der NADH-Fumarat-Reduktase durch KCN ausgeschlossen werden (Schema 4).



Schema 4: Atmungskette von H. parainfluenzae 1 Fleming

NADH-DH_Q: NADH-Dehydrogenase, spezifisch für Ubichinon

Succ.-DH_Q: Succinat-Dehydrogenase, spezifisch für Ubichinon

Succ.-DH_{DMK}: Succinat-Dehydrogenase, spezifisch für Desmethylmenachinon

NADH-DH_{DMK/MK}: NADH-Dehydrogenase, spezifisch für Desmethylmenachinon und Menachinon

Fum.-Re.: Fumarat-Reduktase

Die Reihenfolge der Chinone und Cytochrome ist hypothetisch.

6. Die Atmungskette von H. influenzae RAMC 18 Bensted

Bei H. influenzae RAMC 18 Bensted ist chromatographisch und spektrophotometrisch nur Desmethylmenachinon nachzuweisen. Jedoch zeigen die Extraktions-Reinkorporationsversuche, daß die aerobe Atmung nicht nur durch Desmethylmenachinon sondern auch durch Ubichinon wiederhergestellt werden kann. Die anaerobe Atmung mit Fumarat dagegen bleibt unbeeinflusst. Dieser Befund ist äußerst ungewöhnlich, da die Verwendung von Ubichinon im Elektronentransport eine hohe Unspezifität der Enzyme voraussetzen würde, wogegen allerdings die spezifische Reaktivierung des aeroben Elektronentransports spricht.

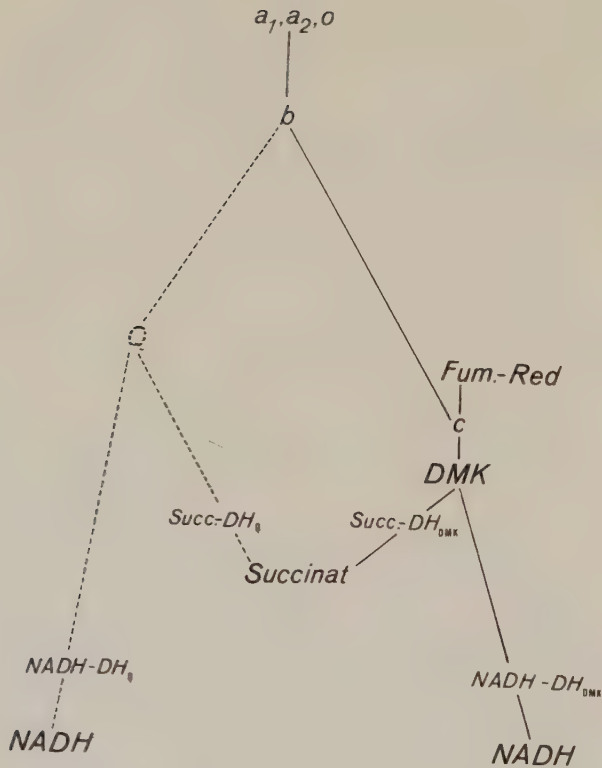
Alle angewandten Methoden weisen darauf hin, daß H. influenzae die gleiche Anordnung der Atmungskettenkomponenten besitzt wie H. parainfluenzae 1 Fleming. Das bedeutet, daß H. influenzae über alle zum aeroben und anaeroben Elektronentransport notwendigen Enzyme verfügt, aber nicht in der Lage ist, Ubichinon zu synthetisieren. Die Aufklärung dieses Phänomens muß weiteren Untersuchungen vorbehalten bleiben (Schema 5).

Influenzae-Stämme können nur in komplexen Medien wachsen, die durch exogene Gaben von Protoporphyrin IX oder Haemin supplementiert werden. Wie schon WHITE (1963) feststellte, variieren die Cytochrommengen mit der Menge des zugesetzten Haemins. Bei $2 \cdot 10^{-3}$ μmol Haemin/ ml wachsen die Bakterien, bilden aber keine nachweisbaren Mengen von Cytochromen aus.

H. influenzae RAMC 18 Bensted bildet bei 10^{-2} μmol Haemin/ ml keine Cytochrome aus. Dabei könnte die zur Zellvermehrung notwendige Energie aus anaeroben Gärungsvorgängen stammen. Es ist jedoch zu beobachten, daß Sauerstoff- und Fumarat-Atmung bei Erreichen des cytochromlosen Zustands noch funktionieren und daß der Desmethylmenachinongehalt bei den verschiedenen Haeminkonzentrationen gleich bleibt. Das weist auf die Fähigkeit hin, daß die Bakterien neben einer möglichen glykolytischen Energiegewin-

nung eine Flavoproteinatmung ohne Beteiligung von Cytochromen vollziehen können. Eine ähnliche ATP-liefernde NADH-Oxydation wurde bei Streptococcus faecalis postuliert (FAUST & VANDEMARK, 1970).

Die Atmungskette von H. influenzae mit Desmethylmenachinon als einzigem Chinon ist demnach anders aufgebaut als die von H. parainfluenzae Bossy No 7 Leidy, einem Bakterienstamm, der ebenfalls nur Desmethylmenachinon enthält. Wie schon dargestellt (S.4), nimmt WHITE ein Netzwerk von Cytochromen und Flavoproteinen an, ebenso wie bei einigen anderen Bakterien (Zusammenfassung bei WHITE & SINCLAIR, 1971).



Schema 5: Atmungskette von H. influenzae RAMC 18
Bensted

Erläuterungen siehe Schema 4!

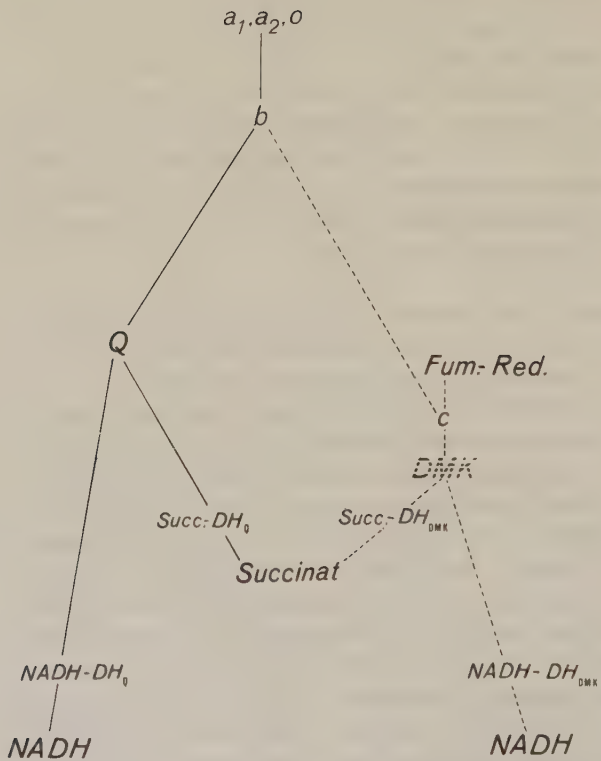
7. Die Atmungskette von H. parainfluenzae

429 Pittman

Wie die Extraktions- Reinkorporationsversuche zeigen, kann bei H. parainfluenzae 429 Pittman ein Elektronentransportsystem mit Ubichinon, Desmethylmenachinon und Menachinon aktiviert werden.

Die Aktivierung des aeroben und anaeroben Elektronentransports durch Naphthochinone setzt auch bei diesem Stamm, ebenso wie bei der Reaktivierung des aeroben Elektronentransports durch Ubichinon bei H. influenzae RAMC 18 Bensted ein vollständiges Enzymsystem für die Atmung mit Naphthochinonen voraus.

Durch die fehlende Fumaratatmung in intakten Bakterien ist es nicht möglich, unterschiedliche Cytochromfunktionen zu bestimmen. Da aber auch b- und c-typische Cytochrome nachzuweisen sind, kann man zusammen mit den Befunden der Extraktions- Reinkorporationsversuche auch bei H. parainfluenzae 429 Pittman eine entsprechende Elektronentransportkette vermuten, ähnlich wie die von H. parainfluenzae 1 Fleming. Dafür spricht auch, daß bei Reduktion der Cytochrome durch Substrate nur ein Absorptionsmaximum bei 556 nm erscheint. Die Elektronen werden in dieser Atmungskette nur über den aeroben Teil des Systems, Ubichinon, b-typische Cytochrome, dem Sauerstoff zugeleitet, da der anaerobe Teil mit Desmethylmenachinon und c-typischen Cytochromen durch das Fehlen des Chinons blockiert ist (Schema 6). Die Befunde über die Atmungskette zeigen, daß die Bakterien bezüglich ihrer Atmungskette als Verlustmutanten einer Elternform mit Ubichinon und Desmethylmenachinon aufzufassen sind, die durch H. parainfluenzae 1 Fleming repräsentiert wird.



Schema 6: Atmungskette von H. parainfluenzae
429 Pittman

Erläuterungen siehe Schema 4!

II. Die Verwendung phänotypischer Kriterien als Grundlage zur Taxonomie

1. Die verwandtschaftlichen Beziehungen der Vertreter der Haemophilus-Gruppe

Wie schon im Einleitungskapitel I erwähnt wurde, wird die Haemophilus-Gruppe einzig durch die Bedürftigkeit für NAD und/oder Haemin bzw. Protoporphyrin charakterisiert. Solche besonderen Ansprüche aber sind auch in anderen wohldefinierten Gruppen zu finden, z.B. Staphylococcus aureus (JENSEN & THOFERN, 1953; DE VRIESE, 1973), E. coli (BELJANSKI, 1955) und Bacteroides ruminicola (CALDWELL et al., 1965). Darüber hinaus konnten WHITE & GRANICK (1963) zeigen, daß die Unfähigkeit zur Haeminsynthese bei einigen X-Faktor abhängigen Haemophilus-Stämmen am Fehlen verschiedener Enzyme in der Porphyrinsynthese liegt.

Trotz dieser Erkenntnisse wurden eine Reihe neuer Haemophilus-Spezies beschrieben, die aufgrund veränderter Kulturbedingungen ein von anderen Haemophilus-Spezies abweichendes Kultivierungsverhalten zeigten, z.B. H. paraphrophilus, H. paraphrohaemolyticus (ZINNEMANN et al., 1968, 1971). Ferner wurden Stämme mit der Vorsilbe "Para" belegt und somit neue Arten geschaffen, weil sie nur den V-Faktor benötigten, sonst aber in allen Merkmalen mit den X- und V-Faktor bedürftigen Stämmen übereinstimmen, z.B. H. parasuis, H. paragallinarum, H. para-haemolyticus (PITTMAN, 1953; BIBERSTEIN & WHITE, 1969).

Die vorliegenden Untersuchungen machen deutlich, daß mit wenigen Ausnahmen die Vertreter der Haemophilus-Gruppe in naher Verwandtschaft stehen, die sich durch die gleichen Enzymaktivitäten im Kohlenhydratabbau und durch den gleichen Energiestoffwechsel darstellt. Ähnliche Befunde machten auch SNEATH & JOHNSON (1973) in ihrer numerisch taxonomischen Studie.

Geht man davon aus, daß der Modus der Energiegewin-

nung - oxydativ-fermentativ bzw.. aerobe-anaerobe Atmung- und der damit korrelierende Chinongehalt ein sehr frühes in der Erdgeschichte entstandenes Merkmal ist, - Fermentation ist das phylogenetisch ältere, Atmungskettenphosphorylierung das jüngere, wobei wiederum anaerober Elektronentransport vor der Möglichkeit zur aeroben Atmung evoluiert wurde (cf. KRÖGER & KLINGENBERG, 1970; DECKER et al., 1970; HALL, 1971), so hat die Zusammensetzung und Funktion der Atmungskette gegenüber X- und V-Faktor Bedürftigkeit größere Aussagekraft. Es scheint allerdings, daß der alleinige Besitz von Ubichinon oder Desmethylmenachinon bei dieser Gruppe von Bakterien durch Verlustmutation zustande gekommen ist, wie die Funktionsuntersuchungen andeuten. Zusammen mit Vertretern der Actinobacillus- und Pasteurella-Gruppe (ZABEL, 1974), bildeten die Haemophilus-Spezies eine gemeinsame Gruppe, aus der einige Vertreter durch Verlustmutation sich entwickelten und sich in anderen biochemischen und physiologischen Merkmalen unterscheiden.

Der taxonomische Wert des Chinongehalts, der ja für große Bakteriengruppen einheitlich ist (BISHOP et al., 1962; JACOBSEN & DAM, 1960; WHISTANCE et al., 1969; JEDISS, 1973; CALLIES, 1973; ZABEL, 1974) wird dadurch nicht gemindert, sondern er hilft vielmehr die Vertreter der "Urgruppe" Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella neu zu definieren.

Der alleinige Besitz von Ubichinon bei H. parainfluenzae 429 Pittman, H. piscium und H. vaginalis scheint diese Stämme aus der Nähe der Haemophilus-Gruppe zu rücken. Das biochemische Erscheinungsbild und das kulturelle Verhalten von H. vaginalis zeigt auch, daß zumindest diese Spezies einer anderen Gruppe zuzuordnen ist. Seine systematische Stellung wird von LAPAGE (1974) und HOLLÄNDER & MANNHEIM (1975) diskutiert.

Die Stellung von H. piscium dagegen ist möglicherweise in der Nähe von H. parainfluenzae 429 Pittman zu suchen. Schema 7 zeigt die zusammenfassende Darstellung der verwandtschaftlichen Beziehungen der

Vertreter der Haemophilus-Gruppe.

Ohne Berücksichtigung der Wachstumsfaktorbedürfnisse ist dann die Gattung Haemophilus neu zu definieren. Wegen des alleinigen Vorkommens von Desmethylmenachinon im Typstamm H. influenzae, wird die Gattung in Anlehnung an ZINNEMANN & BIBERSTEIN (1974) folgendermaßen charakterisiert:

"Kurze bis mittelgroße Zellen, manchmal fadenförmig, mit deutlichem Pleomorphismus; gram-negative, unbewegliche Parasiten von Vertebraten; Desmethylmenachinon als einziges Atmungschinon; Glucoseabbau fermentativ oder fehlend."

Typspezies: H. influenzae

Folgende Spezies schließt die Gattung Haemophilus, soweit in dieser Arbeit untersucht, ein:

H. influenzae, H. parainfluenzae z.T., H. aegyptius, H. aphrophilus, H. paraphrophilus, H. parahaemolyticus, H. paraphrohaemolyticus, H. ducreyi, H. somnus, H. agni, Pasteurella pneumotropica (ZABEL, 1974).

Die Stämme mit Ubichinon und Desmethylmenachinon bilden zusammen mit Actinobacillus equuli, A. ligneresii, P. multocida und P. haemolytica (ZABEL, 1974) eine eigene Gruppe, ebenso wie die nur Ubichinon synthetisierenden H. parainfluenzae 429 Pittman und H. piscium (cf. SNEATH & JOHNSON, 1973).

2. Die Evolution der Chinone

Ein großes Ereignis in der Geschichte der Erde, nämlich der Erwerb der Fähigkeit Sauerstoff mit einem hohen Redoxpotential als Akzeptor für den im Stoffwechsel anfallenden Wasserstoff bzw. Protonen zu verwenden, ermöglichte den Organismen in so großer Zahl verschiedener Formen die Erde zu erobern (cf. WELTE, 1970).

Vorher hatten die Organismen nur zwei Möglichkeiten den anfallenden Wasserstoff zu binden: 1. Durch intramolekularen Einbau, z.B. die in der Glykolyse freigesetzten Protonen werden bei der Bildung von Lactat aus Pyruvat verwendet, und 2. durch die Bindung von Protonen an organische oder auch mög-

licherweise an anorganische Akzeptoren wie SO_4^- oder Fumarat, Akzeptoren mit niedrigem Redoxpotential verglichen mit Sauerstoff.

Rezente Vertreter der ersten Möglichkeit sind die Clostridien (cf. DECKER et al., 1970).

Zur Verwirklichung der zweiten Möglichkeit war es notwendig, einen elektronenübertragenden Stoff, der im Redoxpotential zwischen Substrat und Akzeptor steht zu verwenden. Durch die Evolution des Menachinons konnte solch ein anaerober Elektronentransport vollzogen werden.

Rezente Vertreter des anaeroben Elektronentransports sind Spezies z.B. der Gattungen Desulfovibrio und Bacteroides (MAROC et al., 1970; GIBBONS & ENGLE, 1964; HATCHIKIAN & LE GALL, 1972; JONES, 1972; HATCHIKIAN, 1974). Desulfovibrio macht einen anaeroben Elektronentransport mit SO_4^- und Fumarat unter Verwendung von Menachinon. Mit dem Erwerb des redoxpositiven Ubichinons erst konnte dann in der durch die Tätigkeit der Pflanzen entstandenen oxydierenden Atmosphäre ein aerober Elektronentransport vollzogen werden (cf. KRÖGER & KLINGENBERG, 1970).

Das Errichten eines phylogenetischen Stammbaums der Chinone erfordert einige Voraussetzungen, die man aufgrund des großen Wahrscheinlichkeitsgrades machen kann:

1. Der Erwerb einer Fähigkeit ist viel unwahrscheinlicher als der Verlust von Fähigkeiten.

Das bedeutet, daß die Evolution von neuen Chinonen, für deren Synthese es mehrerer Enzyme bedarf, viel seltener geschieht, als der Ausfall eines Enzyms in einer Synthesekette, der allerdings das ganze System lahmlegen kann.

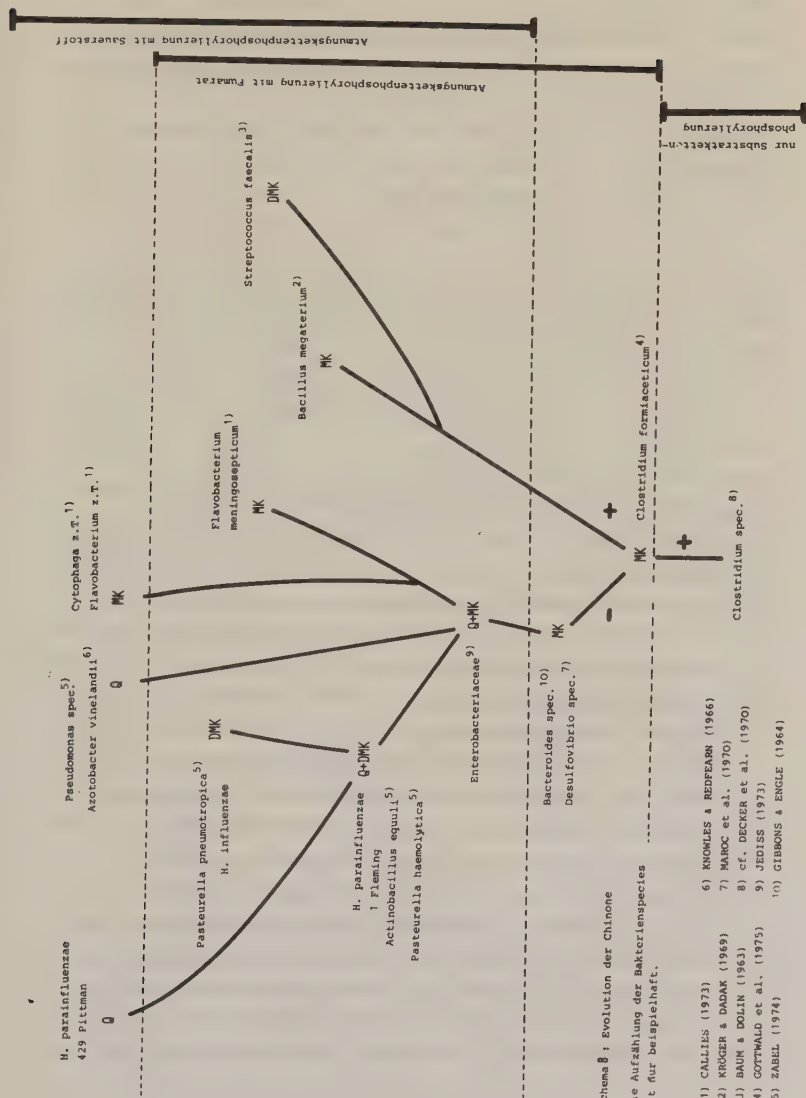
2. Die Evolution eines so komplex synthetisierten Chinons ist nur einmal in der Erdgeschichte vorgekommen. Es gibt keine parallelen Entwicklungen von Chinonen, wohl aber Parallelen beim Verlust von Eigenschaften.

3. Genetische Vorgänge, die ein Genaustausch ermöglichen und somit die zur Chinonsynthese notwendigen Genabschnitte auf einen inkompetenten Stamm übertragen können, fanden nicht statt, da zum einen ziemlich große Genabschnitte übertragen werden müßten, zum anderen aber man dann aber auch hinsichtlich der Chinonzusammensetzung und anderer Merkmale gut definierter Bakteriengruppen alle Chinontypen finden müßte.

Schema 8 zeigt den wahrscheinlichen Stammbaum der Chinone.

Am Anfang standen Organismen, die ihren Energiebedarf ohne terminalen Elektronentransport und somit ohne Chinone deckten (DECKER et al., 1970), wie z.B. die Clostridien. Jedoch finden sich in dieser Bakteriengruppe schon Vertreter mit Menachinon und einem b-typischen Cytochrom (GOTTFWALD et al., 1975), die als Zwischenglieder zwischen den ausschließlich substratkettenphosphorylierenden Clostridien und den fumarat atmenden Desulfovibrio und Bacteroides darstellen. Auf der Stufe der anaeroben Atmung spalten sich dann die gram-negativen von den gram-positiven Prokaryonten ab. In der großen Gruppe der gram-negativen vollzog sich eine vielfache Umgestaltung der Chinonzusammensetzung. Mit der Evolution von Ubichinon, die nur gram-negative Organismen erfaßte, - in gram-positiven ist also kein Ubichinon zu erwarten, was die bisher vorliegenden Untersuchungen bestätigen (LESTER & CRANE, 1959; JACOBSEN & DAM, 1960; BISHOP et al., 1962)-, bildeten sich Organismen mit Ubichinon und Menachinon aus. Rezente Vertreter sind z.B. die Enterobacteriaceae (WHISTANCE & THRELLFALL, 1968; WHISTANCE et al., 1969; JEDISS, 1973).

Innerhalb dieser Gruppe mit Ubichinon und Menachinon verloren dann einige Bakterien wieder die Fähigkeit das eine oder das andere der beiden Chinone zu synthetisieren, wie z.B. die Eubacteriales und Pseudomonadaceae, die nur Ubichinon zu bilden vermögen (BISHOP et al., 1962; WHISTANCE et al., 1969; ZABEL, 1973) und damit die Fähigkeit zur anaeroben



Schema 8 : Evolution der Chinone

Die Aufzählung der Bakterienarten ist nur beispielhaft.

- 1) CALLIES (1973)
- 2) KRÜGER & DADAK (1969)
- 3) BAUM & DOLIN (1963)
- 4) GOTTWALD et al. (1975)
- 5) ZABEL (1974)
- 6) KNOWLES & REDFERN (1966)
- 7) MAROC et al. (1970)
- 8) cf. DECKER et al. (1970)
- 9) JEDISS (1973)
- 10) GIBBONS & ENGLE (1964)

Fumaratatmung verloren, oder Vertreter der Cytophaga- und Flavobacterium-Gruppe, die nur Menachinon enthalten (CALLIES, 1973), wobei auch innerhalb dieser Gruppe wiederum einige Bakterien ausschließlich Sauerstoff veratmen können.

Weiter: Mutationen erfuhren die Ubichinon-Menachinon haltigen Bakterien, indem der Syntheseweg zum Menachinon verändert wurde und Desmethylmenachinon anstelle von Menachinon synthetisiert wurde. Vertreter dieser Chinokombination sind Bakterien der Haemophilus-Actinobacillus-Pasteurella-Gruppe (ZABEL, 1974; HOLLÄNDER & MANNHEIM, 1975).

Auch in dieser Gruppe entwickelten sich durch Verlustmutationen Bakterien mit nur Ubichinon oder nur Desmethylmenachinon, z.B. H. parainfluenzae 429 Pittman mit Ubichinon und ausschließlich Sauerstoffatmung oder H. influenzae RAMC 18 Bensted mit nur Desmethylmenachinon. Diese Evolutionsprozesse haben sicher erst in jüngerer Zeit stattgefunden, da, wie die Extraktions-Reinkorporationsversuche zeigen, noch alle Enzyme für einen aeroben und anaeroben Elektronentransport aktiv sind. In der Reihe der gram-positiven Prokaryonten sind die Evolutionsprozesse bezüglich der Chinone viel geringer. Jedoch ist auch unter diesen Bakterien einmal die Synthesefähigkeit zum Menachinon unterbrochen worden und Desmethylmenachinon resultierte, z.B. Streptococcus faecalis (BAUM & DOLIN, 1963).

Die Entwicklung von Chinonen korreliert mit der Fähigkeit zu atmen bzw. zur Photophosphorylierung, doch ist die aerobe Atmung von Oxydasen, die anaerobe Atmung von Reduktasen abhängig. Die Höhe des Redoxpotentials der terminalen Akzeptoren machte es notwendig, wie schon gesagt, bestimmte elektronentransportierende Substanzen, hier die Chinone, zu "erfinden". Daraus ist zu erklären, daß Ubichinon nur im aeroben, Naphthochinone aber im aeroben und anaeroben Elektronentransport wirksam sein können. Das Redoxpotential bestimmt die Spezifität.

Zusammenfassung

1. In der vorliegenden Untersuchung über den Energiestoffwechsel von Vertretern der Haemophilus-Gruppe wurde dargestellt, daß die Bakterien über intakte Wege des Kohlenhydratabbaus, nämlich Glykolyse, Pentose-Phosphat-Weg, KDPG-Weg und Citratcyclus verfügen und die Fähigkeit zur Gluconeogenese besitzen. Die Aktivitäten der Enzyme dieser katabolischen Wege sind z.T. sehr gering, mit Ausnahme der Malat-Dehydrogenase, die extrem hohe Aktivitäten aufweist, was auf einen möglichen Stoffwechselweg in der Art eines Dicarbonsäurecyclus hinweist.

2. Das für diese Bakteriengruppe typische Chinon ist Desmethylmenachinon, welches allein oder zusammen mit Ubichinon am Elektronentransport beteiligt ist. H. piscium und H. vaginalis besitzen nur Ubichinon, H. parainfluenzae 429 Pittman daneben noch ein nicht identifiziertes Chinon.

Die Chinone liegen ebenso wie die b-typischen und der größte Teil der c-typischen Cytochrome membrangebunden vor. Lediglich geringe Mengen, c-typischer Cytochrome sind löslich.

3. Der Einfluß von Substraten auf die Atmungskettenbestandteile der in komplexen Medien kultivierten Bakterien ist nur bei Verwendung von Formiat oder NADH festzustellen. Diese Substrate steigern die NADH-Oxydase und NADH-Fumarat-Reduktase gegenüber Lactat, Glucose, Succinat oder ohne besondere Supplementierung. Eine qualitative Veränderung der Cytochrome oder Chinone ist nicht erkennbar.

4. Der terminale Akzeptor Sauerstoff erhöht die Wachstumserträge gegenüber Fumarat. In Abwesenheit besonderer terminaler Akzeptoren sind die Erträge am geringsten. Anaerobe Kultivierung mit Fumarat hat eine Erhöhung des Desmethylmenachinongehalts und eine Erniedrigung des Ubichinongehalts zur Folge verglichen mit aeroben Kulturen.

5a) Die Cytochrome werden unter anaeroben Kulturbedingungen derart verändert, daß sich Cytochrom a_1 und a_2 verringern, ebenso wie die b-typischen Cytochrome, c-typische Cytochrome aber vermehrt gebildet werden, was sich als Verschiebung des gemeinsamen Maximums zwischen 552 und 560 nm in den kurzwelligen Bereich bemerkbar macht.

b) Tieftemperaturdifferenzspektren in flüssigem Stickstoff deuten darauf, daß sich in den gemeinsamen b/c-Absorptionsmaxima mehrere b- und c-typische Cytochrome verbergen. Unter anaeroben Kulturbedingungen wird die verstärkte Synthese von c-typischen Cytochromen erkennbar.

c) Die b/c-typischen Cytochrome werden durch Lactat, NADH und Succinat nach Übergang in den anaeroben Zustand reduziert. Der Reduktionsgrad beträgt ca. 60 - 80 % der Reduktion durch Dithionit. Sauerstoff und Wasserstoffperoxyd oxydieren die Cytochrome. Fumarat als Oxydationsmittel hat eine verstärkte Wirkung auf die Oxydation der c-typischen Cytochrome. Dieser Effekt ist besonders bei H. parainfluenzae 1 Fleming ausgeprägt. H. parainfluenzae 429 Pittman kann wegen fehlender Fumarat-Reduktase-Aktivität nicht durch Fumarat oxydiert werden.

6. Die Extraktions- und Reinkorporationsversuche zeigen, daß Ubichinon am Elektronentransport auf Sauerstoff, Desmethylmenachinon aber zusätzlich am Elektronentransport auf Fumarat als terminalen Akzeptor beteiligt ist.

In der aeroben Atmung von H. influenzae RAMC 18 Bensted, ein Bakterium, das nur Desmethylmenachinon bildet, kann dieses Chinon durch Ubichinon ersetzt werden; Menachinon ersetzt das Desmethylmenachinon sowohl in der aeroben als auch in der anaeroben Atmung mit Fumarat. Die gleichen Befunde werden bei H. parainfluenzae 1 Fleming erhoben.

Bei H. parainfluenzae 429 Pittman mit Ubichinon und einem nicht identifiziertem Chinon können Desmethylmenachinon und Menachinon aerobe Atmung mit Sauerstoff und anaerobe Atmung mit Fumarat induzieren, die bei

diesem Stamm in vivo fehlen.

7. Die NADH-Oxydase wird bei den untersuchten Stämmen durch HQNO, Rotenon, KCN und TTA gehemmt. Malonat erniedrigt die Veratmung von Succinat. KCN hat keinen Einfluß auf die NADH-Fumarat-Reduktase im Gegensatz zu Rotenon oder HQNO.

8a) Der terminale Elektronentransport ist bei den drei untersuchten Vertretern prinzipiell gleich. Unterschiede sind lediglich im Chinongehalt festzustellen. Die Enzyme für ein verzweigtes Elektronentransportsystem sind bei den Stämmen vorhanden. Durch das Fehlen von Ubichinon bei H. influenzae RAMC 18 Bensted und Desmethylmenachinon bei H. parainfluenzae 429 Pittman können allerdings die entsprechenden Elektronentransportwege nicht benutzt werden.

Im "aeroben" Weg werden Elektronen von NADH und Succinat über Ubichinon und Desmethylmenachinon auf b-typische Cytochrome übertragen und von da zum Sauerstoff. Im "anaeroben" Weg fließen die Elektronen von den Donatoren über Desmethylmenachinon und c-typischen Cytochromen auf Fumarat.

b) Mit Haeminkonzentrationen unter $1,5 \cdot 10^{-2}$ $\mu\text{mol/ml}$ bildet H. influenzae RAMC 18 Bensted keine Cytochrome aus, ist aber noch in der Lage NADH mit Sauerstoff und Fumarat zu veratmen. Die Desmethylmenachinonsynthese bleibt vom Haemingehalt unbeeinflusst.

9. Die Verwendung der phänotypischen Kriterien, -Atmungskettenbestandteile, biochemische Leistungen, Enzymaktivitäten des Kohlenhydratkatabolismus-, läßt den Schluß zu, daß die Vertreter der Haemophilus-Gruppe als Verlustmutanten von Bakterien mit Menachinon und Ubichinon aufzufassen sind. Innerhalb der Gruppe ging wiederum sekundär die Synthesefähigkeit zu den jeweiligen Chinonen verloren, so daß nach dem Chinongehalt drei Untergruppen festzustellen sind. Auf Grund des Chinongehalts und anderer phänotypischer Kriterien paßt sich H. vaginalis keiner dieser Gruppen an.

Wegen des Vorkommens von Desmethylmenachinon im Typstamm der Haemophilus-Gruppe, H. influenzae, wird die

Gattung ohne besondere Berücksichtigung der Wachstumsfaktoransprüche mit Hilfe der Chinone neu definiert. Neben H. influenzae enthält sie alle weiteren untersuchten Stämme mit Desmethylmenachinon als einzigem Chinon.

10. Es wird ein möglicher Stammbaum der Chinonevolution diskutiert.

Tabelle I: Genus Haemophilus Winslow et al.

Species ¹⁾ gültiger Name	gültige Klassifizierung	Referenzstamm	taxonomischer Status
<u>H. influenzae</u>	WINSLOW et al., 1917	NCTC 4560	
<u>H. parainfluenzae</u>	RIVERS, 1922	?	
<u>H. suis</u>	HAUDUROY et al., 1937	NCTC 4557	Cotyp
<u>H. parasuis</u> ²⁾	BIBERSTEIN & WHITE, 1966		
<u>H. haemolyticus</u>	BERGEY et al., 1923	NCTC 8479 ³⁾	
<u>H. parahaemolyticus</u>	PITTMAN, 1953	NCTC 8479	
<u>H. haemoglobinophilus</u>	MURRAY, 1939	NCTC 1659	Cotyp
<u>H. gallinarum</u>	DELAPLANE et al., 1937	?	
<u>H. paragallinarum</u>	BIBERSTEIN & WHITE, 1966	?	
<u>H. aphrophilus</u>	KHAIRAT, 1940	NCTC 5886	Holotyp
<u>H. paraprophiophilus</u>	ZINNEMANN et al., 1968	NCTC 10557	Cotyp
<u>H. paraprohaemolyticus</u>	ZINNEMANN & DEVARAJ, 1971	NCTC 10670	Holotyp
<u>H. influenzae-murium</u>	LWOFF, 1939	-	
<u>H. ducreyi</u>	BERGEY et al., 1923	?	

Fortsetzung Tabelle I

Species incertae sedis

<u>H. aegyptius</u>	PITTMAN & DAVIS, 1950	NCTC 8502	
<u>H. piscium</u>	SNIESZKO et al., 1950	ATCC 10801	
<u>H. citreus</u>	DIERNHOFER, 1949	-	
<u>H. ovis</u>	MITCHELL, 1925	-	
<u>H. putriorum</u>	HAUDUROY et al., 1937	-	
<u>H. vaginalis</u>	GARDNER & DUKES, 1955	ATCC 14018	Cotyp

Neubeschreibungen

<u>H. somnus</u>	BAILE, 1969	?
<u>H. agni</u>	KENNEDY et al., 1958	?
<u>H. somnifer</u>	MILES et al., 1972	-

- 1) Zusammengestellt nach ZINNEMANN & BIBERSTEIN (1974) mit Ergänzungen
 - 2) Die Stämme benötigen nur den V-Faktor; sie sind identisch mit H. suis.
 - 3) Der Referenzstamm NCTC 8479 benötigt nur den V-Faktor. Er diente als Grundlage der Beschreibung von H. parahaemolyticus (PITTMAN, 1953).
- ? : Ein Referenzstamm ist nicht bekannt.

- : Die Stämme sind in keiner Stammsammlung zu finden (ZINNEMANN & BIBERSTEIN, 1974)

Tabelle II: Untersuchte Bakterienstämme

Species	Stamm	Bezugsquelle bzw. Sammlungsnummer
<u>H. influenzae</u>	RAMC 18 Bensted	NCTC 4560
"		HIM 412-7
"	, Typ b	NCTC 8467
<u>H. parainfluenzae</u>	641 Pittman	HIM 412-6
"		HIM 170-1
"	1 Fleming	NCTC 4101
"	Bossy No 7 Leidy	D. C. WHITE
"	429 Pittman	ATCC 7901
"	6 Lovell	NCTC 3438
<u>H. paragaillinarum</u>	XIII Friedberger	NCTC 1659
<u>H. haemoglobinophilus</u>	1374 Shope	NCTC 4557
<u>H. parasuis</u>	180-a Pittman	ATCC 11116
<u>H. aegyptius</u>	Leidy	D. C. WHITE
"	Snieszko 16	ATCC 10801
<u>H. piscium</u>	Dukes 594	ATCC 14018
<u>H. vaginalis</u>		

Fortsetzung Tabelle II:

Species	Stamm	Bezugsquelle bzw. Sammlungsnummer
<u>H. paraphrophilus</u>	Funagli Zinnemann	NCTC 10557
<u>H. parahaemolyticus</u>	536 Pittman	NCTC 8479
<u>H. paraphrohaemolyticus</u>	L 1 Zinnemann	NCTC 10670
<u>H. aphrophilus</u>	PM 1 Khairat	NCTC 5886
<u>H. ducreyi</u>	Zierdt IX	ATCC 27722
<u>H. agni</u>	California 1343 Knight	A.B. Hoerlein
<u>H. somnus</u>	IVDL 1080 Ross	R.F. Ross
"	IVDL 1229 Ross	R.F. Ross

Tabelle IV: Cytochrome von Zellen der frühen stationären Wachstumphase, a) belüfteter und b) sauerstoff-limitierter Kulturen mit Zusatz von 50 mM Na₂-Fumarat

Stamm Sammlungsnummer	Wachstums- bedingungen	CYTOCHROME			
		Charakteristische Absorptionsmaxima ($\Delta E \times \text{cm}^{-1} \times \text{gProt.}^{-1}$)			
		a ₁ 594-599	d (=a ₂) 632-636	o 554-560	b+c 550-560
<u>H. influenzae</u> NCTC 4560	a:	-	-	0,48	0,82
	b:	-	-	-	-
<u>H. influenzae</u> HIM 412-7	a:	-	-	1,2	6,56
	b:	-	-	-	-
<u>H. influenzae</u> NCTC 8467	a:	-	-	1,0	2,5
	b:	-	2,46	46,0	49,0
<u>H. parainfluenzae</u> HIM 170-1	a:	-	2,72	4,5	11,3
	b:	3,1	32,1	2,2	30,9
<u>H. paraphro- haemolyticus</u> NCTC 10670	a:	-	-	-	-
	b:	-	-	20,5	20,6
<u>H. agni</u> A.B.Hoerlein	a:	0,12	1,3	0,6	3,8
	b:	-	-	-	-
<u>H. ducreyi</u> ATCC 27722	b:	-	2,4	6,6	23,0
<u>H. parainfluenzae</u> HIM 412-6	a:	0,69	5,12	19,4	43,8
	b:	-	-	9,8	102,3
<u>H. parainfluenzae</u> NCTC 4101	a:	-	3,0	9,4	9,5
	b:	-	-	92,8	54,2
<u>H. parainfluenzae</u> HIM 449-8	a:	2,24	12,3	102,0	41,4
	b:	1,74	5,22	24,4	92,6
<u>H. acgyptius</u> ATCC 11116	a:	-	-	0,6	2,96
	b:	-	5,48	20,6	10,9

Fortsetzung Tabelle IV:

C Y T O C H R O M E

Stamm Sammlungsnummer	Wachstums- bedingungen	Charakteristische Absorptionsmaxima ($\Delta E \times cm^{-1} \times gProtein^{-1}$)			
		a ₁ 594-599	d (=a ₂) 632-636	o 554-560	b+c 550-560
<u>H. aegyptius</u>	a:	-	-	1,0	0,81
HIM 450-4	b:	-	3,28	6,2	10,5
<u>H. paraphrophilus</u>	a:	-	3,42	4,02	29,4
NCTC 10557	b:	-	-	24,1	10,2
<u>H. parahaemolyticus</u>	a:	-	2,97	3,96	27,6
NCTC 8479	b:	-	-	21,1	47,2
<u>H. haemoglobinophilus</u>	a:	-	0,86	2,14	3,42
NCTC 1659	b:	-	1,9	5,83	8,6
<u>H. parasuis</u>	a:	1,47	7,35	0,7	19,1
NCTC 4557	b:	-	6,51	22,4	103,4
<u>H. paragallinarum</u>	a:	-	4,95	2,0	15,8
NCTC 3438	b:	-	-	6,2	13,7
<u>H. parainfluenzae</u>	a:	3,64	24,3	3,4	48,6
ATCC 7901	b:	-	-	4,48	5,6
<u>H. piscium</u>	a:	-	-	3,06	13,7
ATCC 10801	b:	-	-	1,8	2,36
<u>H. vaginalis</u>	a:	0,4	-	-	2,04
/ ATCC 14018	b:	-	-	1,65	0,33

- = nicht nachgewiesen

. = nicht geprüft

? = nicht identifiziert

Tabelle V: Chinone von Zellen der frühen maximal-stationären Wachstumsphase, a) belüfteter und b) sauerstoff-limitierter Kulturen mit Zusatz von 50 mM Na₂-Fumarat

Stamm Sammlungsnummer	Wachstums- bedingun- gen	Chinongehalt (μ mol x gProt. ⁻¹)		Effekt von Fumarat auf sauerstoff- limitierte Wachstumser- träge
		Q	DMK	
<u>H. influenzae</u> NCTC 4560	a:	-	1,06	
	b:	-	1,44	+
<u>H. influenzae</u> HIM 412-7	a:	-	1,70	
	b:	-	1,50	+
<u>H. influenzae</u> NCTC 8467	a:	-	2,90	
	b:	-	3,70	+
<u>H. parainfluenzae</u> HIM 170-1	a:	-	1,04	
	b:	-	1,43	+
<u>H. parainfluenzae</u> HIM 449-8	a:	-	3,04	
	b:	-	2,80	+
<u>H. aegyptius</u> ATCC 11116	a:	-	3,35	
	b:	-	9,40	+
<u>H. aegyptius</u> HIM 450-4	a:	-	3,70	
	b:	-	2,00	+
<u>H. paraphrophilus</u> NCTC 10557	a:	-	0,46	
	b:	-	0,96	+
<u>H. parahaemolyticus</u> NCTC 8479	a:	-	2,19	
	b:	-	2,60	+

Fortsetzung Tabelle V

Stamm Sammlungsnummer	Wachstums- bedingun- gen	Chinongehalt ($\mu\text{mol} \times$ gProt. ⁻¹)		Effekt von Fumarat auf sauerstoff- limitierte Wachstumser- träge
		Q	DMK	
<u>H. paraphrohaemo- lyticus</u> NCTC 10670	a:	-	7,60	
	b:	-	1,70	+
<u>H. agni</u> A.B.Hoerlein	a:	-	1,00	
	b:	-	2,70	+
<u>H. ducreyi</u> ATCC 27722	a:	.	.	
	b:	-	0,80	.
<u>H. somnus</u> IVDL 1080	a:	-	0,45	
	b:	.	.	.
<u>H. somnus</u> IVDL 1229	a:	-	0,73	
	b:	.	.	.
<u>H. parainfluenzae</u> HIM 412-6	a:	<0.10	1,52	
	b:	-	1,61	+
<u>H. parainfluenzae</u> NCTC 4101	a:	0,46	0,22	
	b:	0,21	0,29	+
<u>H. haemoglobinophila</u> NCTC 1659	a:	1,21	1,20	
	b:	0,98	2,30	+
<u>H. parasuis</u> NCTC 4557	a:	1,49	-	
	b:	0,32	0,84	+
<u>H. paragallinarum</u> NCTC 3438	a:	2,90	0,40	
	b:	2,20	0,55	+

Fortsetzung Tabelle V

Stamm	Wachstums- bedingun- gen	Chinongehalt ($\mu\text{mol} \times$ gProt.^{-1})		Effekt von Fumarat auf sauerstoff- limitierte Wachstumser- träge
Sammlungsnummer		Q	DMK	
<u>H. parainfluenzae</u>	a:	1,09	?	
ATCC 7901	b:	1,30	?	-
<u>H. piscium</u>	a:	0,30	-	
ATCC 10801	b:	0,13	-	-
<u>H. vaginalis</u>	a:	<0,10	-	
ATCC 14018	b:	<0,10	-	-

- = nicht nachgewiesen

. = nicht geprüft

? = nicht identifiziert

+ = Zunahme der Wachstumserträge bei sauerstoff-limitierter
Kultivierung mit Fumarat

Tabelle VI; Einfluß von Glucose bzw. Lactat auf Kulturerträge und End-pH-Wert aerober und anaerober mit Fumarat supplementierter Kulturen in Proteose-Pepton-Medium

Stamm	C- Quelle	Kulturertrag aerob (mg/ml)	pH-Wert aerob	Kulturertrag anaerob (mg/ml)	pH-Wert anaerob
<u>H. influenzae</u> ¹⁾					
RAMC 18 Ben- sted	Glucose	0,48	8,0	0,25	5,7
	Lactat	0,48	8,0	0,07	6,5
	ohne	0,14	8,0	0,07	7,2
<u>H. parainflu-2)</u>					
1 Fleming	Glucose	0,42	7,2	0,09	5,6
	Lactat	0,43	7,1	0,02	6,5
	ohne	0,11	7,2	0,01	7,0
<u>H. parainflu-3)</u>					
429 Pittman	Glucose	0,22	6,6	-	7,2
	Lactat	0,22	6,6	-	7,2
	ohne	0,18	7,2	-	7,2
<u>H. aegyptius</u>					
180-a Pitt- man	Glucose	0,40	5,8	0,19	5,8
	Lactat	0,95	7,0	0,18	6,5
	ohne	0,17	7,0	0,11	6,5

Der pH-Wert wurde nach aerober und anaerober Kultivierung mit Fumarat und den zusätzlichen Kohlenstoffquellen in Proteose-Pepton-Medium, pH 7,2, in der stationären Phase gemessen. Die Werte stellen das Mittel aus drei Ansätzen dar. 1) Messung nach 16 Std., 2) nach 20 Std, 3) nach 24 Std.

Tabelle VII: Atmungsaktivitäten ($\text{ml O}_2 \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gprotein}^{-1}$) von mit Sauerstoff bzw. mit Fumarat als Endakzeptor kultivierten Bakterien gegenüber verschiedenen Kohlenhydraten bzw. Metaboliten des Kohlenhydratkatabolismus

Substrat	<u>H. influenzae</u>		<u>H. parainfluenzae</u>		<u>H. parainfluenzae</u>		<u>H. aegyptius</u>	
	<u>RAMC 18 Bensted</u>	<u>1 Fleming</u>	<u>O₂</u>	<u>Fumarat</u>	<u>O₂</u>	<u>Fumarat</u>	<u>429 Pittman</u>	<u>180-a Pittman</u>
Elektronenakzeptor:								
endogen	0,08	0,03	0,02	0,03	0,05	0,02		
Glucose	0,32	0,54	0,29	0,49	0,29	0,04		
Fructose	0,00	0,00	0,11	0,06	0,20	0,01		
Fructose-1,6-PP	0,51	0,67	0,11	0,06	0,15	0,01		
6-Phosphogluconat	0,36	0,20	0,29	0,66	0,42	1,58		
Ribose-5-P	0,72	0,58	0,11	0,50	0,01	0,11		
α - Glycero-P	0,07	0,16	0,07	0,14	0,44	0,01		
Pyruvat	0,10	0,22	0,09	0,09	0,05	0,04		
Acetyl-P	0,32	0,10	0,07	<0,01	0,10	0,02		

Fortsetzung Tabelle VII

<u>H. influenzae</u>		<u>H. parainfluenzae</u>		<u>H. parainfluenzae</u>		<u>H. aegyptius</u>	
RAMC 18 Beusted		1 Fleming		429 Pittman		180-a Pittman	
Elektronenakzeptor:							
	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂
Isocitrat	0,05	0,48	0,13	0,28	0,07	0,42	
α-Ketoglutarat	0,07	0,22	0,07	0,17	0,15	<0,01	
Succinat	0,45	0,14	0,37	1,49	0,48	0,74	
Fumarat	0,29	0,14	0,44	0,33	0,15	0,01	
Malat	0,05	0,03	0,18	0,11	0,05	<0,01	
Formiat	0,75	0,29	0,22	0,08	0,39	<0,01	
Lactat	1,26	0,58	0,47	0,17	0,19	2,58	
Äthanol	0,65	0,05	0,00	0,00	0,05	<0,01	
Acetat	0,03	0,03	<0,01	0,33	0,05	<0,01	

Fortsetzung Tabelle VII

<u>H. influenzae</u>	<u>H. parainfluenzae</u>	<u>H. aegyptius</u>
RAMC 18 Bensted	1 Fleming	180-a Pitt-
	man	man

Elektronenakzeptor:

	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	O ₂
Glutamat	0,03	0,13	0,04	0,00	0,24	0,02
Aspartat	0,04	0,03	0,00	0,00	0,05	0,03
Lysin	0,03	0,05	0,00	0,00	<0,01	1,70
NADH	0,32	0,80	0,61	1,65	1,06	2,60

Der Sauerstoffverbrauch gewaschener Suspensionen intakter Zellen in 0,1 M Tris-HCl-Puffer, pH 7,2 wurde nach Zugabe von verschiedenen Substraten wie im Methodenteil beschrieben, bestimmt. Zu 0,6 ml einer ca. 2 mg/ml Bakterientrockensubstanz enthaltenden Suspension wurde je 100 µl des jeweiligen Substrats zugegeben und die Sauerstoffabnahme im Reaktionsgefäß gemessen. NADH wurde in fester Form, Äthanol 96 % zugegeben. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Proteose-Pepton-Medium mit 0,5 % (w/v) Glucose und den terminalen Akzeptoren Sauerstoff bzw. Fumarat. Die endogene Atmung wurde jeweils subtrahiert. Die Zahlen geben die Atmungsaktivität in ml O₂·min⁻¹·g Protein⁻¹ an.

Tabelle VIII a-d: Enzyme des Kohlenhydrat-Katabolismus nach Kultivierung mit unterschiedlichen Substraten und Sauerstoff bzw. Fumarat als terminale Elektronenakzeptoren in Proteose-Pepton-Medium.

Tabelle VIII a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

C-Quelle· Elektronen- akzeptor	Glucose		Lactat		ohne C-Quelle	
	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat
1) Fructose-1,6- PP-Aldolase	170,0	320,0	66,9	149,5	509,4	83,8
2) KDPG-Aldolase	18,9	9,5	22,9	11,8	9,5	16,1
4) 6-P-Gluconat- DH	180,0	.	47,3	28,9	4,9	5,0
1) PEP-Kinase	4,3	2,9	3,1	4,2	2,2	3,1
2) Lactat-DH	16,8	20,8	18,0	52,4	22,4	26,6
4) Aconitase	4,8	2,6	8,9	2,1	0,5	1,3
4) Isocitrat-DH	5,0	2,1	10,9	< 0,05	0,5	1,0
5) Citrat-Lyase	13,7	27,2	3,1	9,7	2,7	5,3
6) Fumarase	2,1	< 0,05	53,5	0,1	< 0,05	< 0,05
1) Malat-DH	13560	13680	14901	12752	13240	17300
3) Malat-Enzym	9,1	37,1	19,1	8,4	3,5	4,0
1) PEP-Carboxy- Kinase	66,3	20,4	17,6	10,0	3,4	23,8
1) NADH-Fumarat- Reduktase	4,8	26,7	6,9	35,1	6,1	12,6

Die Messung der Enzymaktivität erfolgte im partikelfreien (123 000xg) Überstand außer bei der 6-P-Gluconat-DH und der NADH-Fumarat-Reduktase, deren Aktivität in der beschallten Bakteriensuspension bestimmt wurde. Die Zahlen geben die Enzymaktivitäten in $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gProtein}^{-1}$ an.

1) NADH-Abnahme bei 25°C; 2) NADH-Abnahme bei 37°C; 3) NADPH-Bildung bei 37°C; 4) NADPH-Bildung bei 25°C; 5) NADH-Abnahme bei 30°C; 6) Fumarat-Bildung bei 25°C

Tabelle VIII b: H. parainfluenzae 1 Fleming

C-Quelle:	Glucose		Lactat		ohne C-Quelle	
Elektronen- akzeptor;	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat
Fructose-1,6- PP-Aldolase	565,2	104,4	210,4	214,0	200,0	72,8
KDPG-Aldolase	12,6	18,2	16,5	40,4	36,8	7,3
6-P-Gluconat-DH	73,6	180,1	81,9	60,3	58,0	52,2
PEP-Kinase	2,6	0,1	7,3	7,2	6,0	2,4
Lactat-DH	49,0	165,2	30,3	87,4	36,3	16,4
Aconitase	13,7	1,1	<0,05	<0,05	<0,05	4,6
Isocitrat-DH	29,2	1,1	<0,05	<0,05	<0,05	0,58
Citrat-Lyase	8,6	7,9	8,7	5,0	2,6	2,4
Fumarase	4,3	<0,05	2,8	<0,05	<0,05	0,1
Malat-DH	15900	19704	14812	14854	9057	14103
Malat-Enzym	41,0	<0,05	<0,05	<0,05	0,05	20,8
PEP-Carboxy- kinase	13,1	4,5	13,0	75,4	19,3	16,8
NADH-Fumarat- Reduktase	30,0	46,2	4,8	43,2	41,7	21,5

Erläuterungen siehe Tabelle VIII a!

Tabelle VIII c: H. parainfluenzae 429 Pittman

C-Quelle: Glucose Lactat ohne C-Quelle

Elektronen-
akzeptor:

O₂

O₂

O₂

	O ₂	O ₂	O ₂
Fructose-1,6-PP-Aldolase	302,0	308,1	499,9
KDPG-Aldolase	9,6	7,6	3,9
6-P-Gluconat-DH	70,2	34,1	49,3
PEP-Kinase	7,8	8,1	0,8
Lactat-DH	167,0	40,6	137,8
Aconitase	19,1	< 0,05	1,5
Isocitrat-DH	13,2	< 0,05	2,5
Citrat-Lyase	11,3	10,6	0,4
Fumarase	3,4	4,8	0,1
Malat-DH	1451	1848	1735
Malat-Enzym	130,0	1,5	< 0,05
PEP-Carboxy-Kinase	27,3	10,3	5,0
NADH-Fumarat-Reduktase	-	-	-

Erläuterungen siehe Tabelle VIII a!

Tabelle VIII d: H. aegyptius 180a Pittman

C-Quelle: Elektronen- akzeptor:	Glucose		Lactat		ohne C-Quelle	
	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat
Fructose-1,6- PP-Aldolase	81,1	156,8	161,9	104,5	17,5	209,1
KDPG-Aldolase	4,0	4,0	23,1	2,5	8,7	2,5
6-P-Gluconat-DH	13,5	26,6	4,1	19,5	6,0	12,3
PEP-Kinase	13,6	7,7	15,2	1,8	1,3	1,6
Lactat-DH	9,1	18,9	46,7	15,7	7,0	22,0
Aconitase	< 0,05	< 0,05	11,0	< 0,05	1,2	< 0,05
Isocitrat-DH	< 0,05	< 0,05	7,7	< 0,05	1,6	< 0,05
Citrat-Lyase	3,5	2,6	0,05	1,0	1,0	1,5
Fumarase	.	.	.	.	.	.
Malat-DH	439,4	133,4	642,5	98,6	331,1	122,1
Malat-Enzym	0,05	1,6	6,4	0,5	1,5	0,05
PEP-Carboxy- Kinase	8,8	8,4	4,9	11,9	1,5	6,6
NADH-Fumarat- Reduktase	11,0	67,5	40,7	26,7	9,0	33,5

Erläuterungen siehe Tabelle VIII a!

Tabelle IX a-c: Löslichkeit von NADH-oxydase, Cytochromen und Chinonen spätexponentieller, aerob kultivierter Zellen

Tabelle IXa: H. influenzae RAMC 18 Bensted

	NADH-Oxydase	DMK	Cytochrom b+c	<u>NADH-Oxydase</u> Cytochrom b+c
beschallt	42,1	0,37	29,0	1,45
Überstand	2,7	-	7,6	0,37
Sediment	42,5	0,60	32,7	1,30

Tabelle IXb: H. parainfluenzae 1 Fleming

	NADH-Oxydase Q		DMK	Cytochrom b	c	<u>NADH-Oxydase</u> Cytochrom c
beschallt	146,5	2,8	0,73	10,6	12,1	12,0
Überstand	9,8	-	-	-	6,7	1,5
Sediment	395,4	4,1	1,65	26,4	19,2	20,6

Tabelle IX c: H. parainfluenzae 429 Pittman

	NADH-Oxydase	Q	Cytochrom b	c	<u>NADH-Oxydase</u> Cytochrom c
beschallt	165,7	0,77	11,3	16,2	10,2
Überstand	11,2	-	-	11,6	0,9
Sediment	241,8	1,5	17,6	13,0	18,6

Die Bakterien wurden aerob mit Zusatz von 0,5% (w/v) Glucose in Proteose-Pepton-Medium kultiviert. Die Bestimmung der NADH-Oxydase ($\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gProtein}^{-1}$), der Chinone ($\mu\text{mol} \cdot \text{gProtein}^{-1}$) und der Cytochrome ($\Delta\text{E} \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{gProtein}^{-1}$) erfolgte nach Desintegration der Zellen mit Ultraschall und Zentrifugation, 60 min bei 123 000xg. -: nicht nachgewiesen

Tabelle X a-c: Einfluß von Glucose, Lactat, Succinat und Formiat auf Cytochrom- und Chinongehalt nach Kultivierung in Proteose-Pepton-Medium mit Sauerstoff bzw. Fumarat als terminale Elektronenakzeptoren

Tabelle Xa: H. influenzae RAMC18 Bensted

Substrat: Elektronen- akzeptor:	Glucose		Lactat		Succinat		Formiat		ohne	
	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat
Cytochrom:										
a ₁ (596-600)	1,9	1,2	0,6	-	0,17	0,38	0,5	0,8	0,9	-
a ₂ (628-632)	1,8	0,8	2,3	1,2	0,17	0,38	0,5	0,4	2,7	4,3
c (553-557)	3,3	26,0	6,2	35,9	.	.	4,2	11,9	6,5	32,3
b (558)	48,4	-	93,5	-	2,6	-	-	-	78,7	-
c (552)	-	58,8	-	155,6	-	79,5	34,3	67,4	-	142,1
Chinon:										
DMK	1,00	1,46	1,20	1,03	2,45	4,95	0,92	2,50	0,20	1,00

Cytochromgehalt: $\Delta E \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{gProtein}^{-1}$; Chinongehalt: $\mu\text{mol.gProtein}^{-1}$; - : nicht nachgewiesen; . : nicht geprüft; ? : nicht identifiziert

Tabelle Xb, H. parainfluenzae 1 Fleming

Substrat: Elektronen- akzeptor	Glucose		Lactat		Succinat		Formiat		ohne	
	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat	O ₂	Fumarat
Cytochrom:										
a ₁ (596-600)	0,38	-	1,5	-	1,1	0,6	1,2	2,2	0,8	-
a ₂ (628-632)	-	-	6,1	-	8,2	1,1	2,4	2,7	4,7	-
o (553-557)	4,6	5,9	1,5	15,4	1,1	2,7	11,9	14,0	1,6	9,8
b (558)	15,9	-	6,9	-	14,4	-	-	-	7,8	-
c (552)	-	64,0	-	34,6	-	23,4	48,9	53,7	-	18,2
Chinon:										
Q	3,1	0,3	3,4	2,1	4,1	1,3	1,9	1,2	1,8	0,7
DMK	0,4	0,4	0,4	0,9	0,8	0,6	0,3	0,3	0,2	0,4

Erläuterungen siehe Tabelle X a!

Tabelle X c: H. parainfluenzae 429 Pittman

Substrat: Glucose Elektronen- akzeptor:	Lactat O ₂	Succinat O ₂	ohne O ₂
Cytochrom: a ₁ (596-600)	0,8	0,6	0,5
a ₂ (628-632)	3,3	3,3	3,5
o (553-557)	1,1	8,2	1,8
b/c (556)	8,0	19,4	8,2
Chinon: Q	0,4	1,7	1,1
DMK	?	?	?

Erläuterungen siehe Tabelle X a!

Tabelle XI: NADH-Oxydase- und NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität spätexponentieller Zellen in Abhängigkeit vom Substrat und terminalen Elektronenakzeptor

Stamm:	<u>H. influenzae</u> RAMC 18 Bensted				<u>H. parainfluenzae</u> 1 Fleming				<u>H. parainfluenzae</u> 429 Pittman	
	O ₂		Fumarat		O ₂		Fumarat		A	B
Elektronen- akzeptor:	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
Substrat:										
NADH	112,6	45,3	92,0	63,1	203,2	54,8	145,3	128,9	230,8	0
Lactat	41,0	39,9	112,9	99,2	55,6	47,7	112,8	75,2	170,4	0
Succinat	56,4	50,5	127,9	125,2	24,7	8,0	23,5	22,7	122,3	0
Formiat	212,1	119,8	112,0	58,1	163,0	51,1	99,2	65,8	-	-
Glucose	43,8	40,7	108,6	89,0	98,2	30,0	73,5	65,5	357,2	0
ohne Substrat	34,7	19,0	91,4	82,2	54,2	10,1	76,6	69,8	122,3	0

Die Kultivierung erfolgte in Proteose-Pepton-Medium mit Substratkonzentrationen von jeweils 0,5 % (w/w) und Sauerstoff bzw. Fumarat als terminale Elektronenakzeptoren.

A : NADH-Oxydase-Aktivität ($\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gprotein}^{-1}$)

B : NADH-Fumarat-Reduktase-Aktivität ($\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{gprotein}^{-1}$)

Tabelle XII a-c: Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Veratmung einiger Substrate

Tabelle XII a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

aerobe Kultivierung

Substrat:	NADH		Lactat		Succinat	
	Konz. (Mol)	Hemmung(%)	Konz. (Mol)	Hemmung(%)	Konz. (Mol)	Hemmung(%)
<u>Hemmstoff:</u>						
Rotenon	$5 \cdot 10^{-2}$	85	10^{-2}	65	$6 \cdot 10^{-2}$	0
HQNO	$2 \cdot 10^{-6}$	100	$2 \cdot 10^{-5}$	100	$2 \cdot 10^{-6}$	100
KCN	$6 \cdot 10^{-3}$	79	10^{-2}	54	$6 \cdot 10^{-3}$	72
Malonat	$8 \cdot 10^{-4}$	47	$4 \cdot 10^{-3}$	2	$3 \cdot 10^{-4}$	65
TTA	$4 \cdot 10^{-4}$	100	$2 \cdot 10^{-4}$	100	$8 \cdot 10^{-4}$	98

anaerobe Kultivierung mit Fumarat

Rotenon	$5 \cdot 10^{-2}$	68	$5 \cdot 10^{-3}$	87	$2 \cdot 10^{-2}$	10
HQNO	$2 \cdot 10^{-5}$	100	10^{-4}	68	$8 \cdot 10^{-5}$	70
KCN	$2 \cdot 10^{-3}$	92	$4 \cdot 10^{-3}$	100	$4 \cdot 10^{-3}$	100
Malonat	$4 \cdot 10^{-3}$	0	$4 \cdot 10^{-3}$	0	$4 \cdot 10^{-3}$	100

Die Atmung wurde, wie unter "Atmungsraten" im Methodenteil beschrieben, von spätexponentiellen, in Proteose-Pepton-Medium gewachsenen Zellen gemessen. Das Medium wurde mit 0,5% (w/v) Glucose supplementiert.

Tabelle XII b: H. parainfluenzae 1 Fleming

aerobe Kultivierung

Substrat:	NADH		Lactat		Succinat	
	Konz. (Mol)	Hemmung (%)	Konz. (Mol)	Hemmung (%)	Konz. (Mol)	Hemmung (%)
<u>Hemmstoff:</u>						
Rotenon	$5 \cdot 10^{-2}$	77	$2 \cdot 10^{-2}$	100	$2 \cdot 10^{-2}$	40
HQNO	$4 \cdot 10^{-5}$	91	$4 \cdot 10^{-5}$	94	$3 \cdot 10^{-5}$	85
KCN	$4 \cdot 10^{-3}$	71	$4 \cdot 10^{-3}$	98	$8 \cdot 10^{-3}$	80
Malonat	$8 \cdot 10^{-4}$	0	$8 \cdot 10^{-4}$	28	$6 \cdot 10^{-4}$	82
TTA	$8 \cdot 10^{-4}$	96	$9 \cdot 10^{-4}$	99	$8 \cdot 10^{-4}$	91

anaerobe Kultivierung mit Fumarat

Rotenon	$8 \cdot 10^{-3}$	100	$8 \cdot 10^{-3}$	93	$2 \cdot 10^{-2}$	29
HQNO	$9 \cdot 10^{-6}$	96	$3 \cdot 10^{-5}$	100	$5 \cdot 10^{-5}$	97
KCN	$7 \cdot 10^{-3}$	92	$4 \cdot 10^{-3}$	100	$5 \cdot 10^{-3}$	100
Malonat	$2 \cdot 10^{-3}$	25	$4 \cdot 10^{-3}$	40	$6 \cdot 10^{-3}$	93

Erläuterungen siehe Tabelle XII a!

Tabelle XII c: H. parainfluenzae 429 Pittman

aerobe Kultivierung

Substrat:	NADH		Lactat		Succinat	
	Konz. (Mol)	Hemmung(%)	Konz. (Mol)	Hemmung(%)	Konz. (Mol)	Hemmung(%)
Hemmstoff:						
Rotenon	$5 \cdot 10^{-2}$	92	$6 \cdot 10^{-2}$	55	$6 \cdot 10^{-2}$	30
HQNO	$2 \cdot 10^{-5}$	96	$2 \cdot 10^{-5}$	75	$2 \cdot 10^{-5}$	78
KCN	$4 \cdot 10^{-3}$	94	$4 \cdot 10^{-3}$	96	$4 \cdot 10^{-3}$	93
Malonat	10^{-1}	0	10^{-1}	0	10^{-1}	82
TTA	$2 \cdot 10^{-3}$	89	$8 \cdot 10^{-4}$	91	$4 \cdot 10^{-4}$	100

Erläuterungen siehe Tabelle XII a!

Tabelle XIII a-b: Wirkung verschiedener Hemmstoffe auf die Fumaratatmung

Tabelle XIII a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

aerobe Kultivierung

	Konz. (Mol)	Hemmung (%)
Hemmstoff:		
Rotenon	$3 \cdot 10^{-3}$	99
HQNO	$5 \cdot 10^{-7}$	98
KCN	$8 \cdot 10^{-3}$	0
Malonat	10^{-4}	13

anaerobe Kultivierung mit Fumarat

	Konz. (Mol)	Hemmung (%)
Hemmstoff:		
Rotenon	$2 \cdot 10^{-3}$	98
HQNO	$4 \cdot 10^{-6}$	94
KCN	$2 \cdot 10^{-3}$	7
Malonat	$3 \cdot 10^{-3}$	28

Die Fumaratatmung, NADH-Fumarat-Reduktase, wurde wie im Methodenteil beschrieben, gemessen. Die Kultivierung in Proteose-Pepton-Medium erfolgte mit Zusatz von 0,5 % (w/v) Glucose

Tabelle XIII b: H. parainfluenzae 1 Fleming

aerobe Kultivierung

	Konz. (Mol)	Hemmung(%)
Hemmstoff:		
Rotenon	10^{-2}	100
HQNO	$2 \cdot 10^{-6}$	89
KCN	$7 \cdot 10^{-1}$	26
Malonat	$5 \cdot 10^{-4}$	37

anaerobe Kultivierung mit Fumarat

Hemmstoff:		
Rotenon	$8 \cdot 10^{-2}$	95
HQNO	$4 \cdot 10^{-6}$	94
KCN	$3 \cdot 10^{-1}$	2
Malonat	$3 \cdot 10^{-3}$	25

Erläuterungen siehe Tabelle XIII a!

Tabelle XIV a-c: Beteiligung der Cytochrome am Elektronentransport

Tabelle XIV a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

aerobe Kultivierung

Proben- Küvette	minus Referenz- Küvette	Cytochrom b+c- Gehalt (557 nm)	Reduktions- grad(%)
Na ₂ S ₂ O ₄	- H ₂ O ₂	99,2	100
Lactat	- H ₂ O ₂	80,9	80
NADH	- H ₂ O ₂	98,4	99
Succinat	- H ₂ O ₂	47,5	49

anaerobe Kultivierung mit Fumarat

Na ₂ S ₂ O ₄	- H ₂ O ₂	24,0	100
Lactat	- H ₂ O ₂	21,6	90
NADH	- H ₂ O ₂	19,9	83
Succinat	- H ₂ O ₂	19,9	83

Die Kultivierung der Bakterien erfolgte in Proteose-Pepton-Medium mit Zusatz von 0,5% (w/v) Glucose aerob bzw. anaerob mit Fumarat. Bestimmung des Reduktionsgrades wie im Methodenteil beschrieben; Cytochromgehalt in $\Delta E \cdot \text{cm}^{-1} \cdot \text{g Protein}^{-1}$.

Tabelle XIV b: H. parainfluenzae 1 Fleming

aerobe Kultivierung

Proben- Küvette	minus Referenz- Küvette	Cytochrom b+c - Gehalt (556nm)	Reduktions- grad (%)	Cytochrom b- Gehalt (560nm)	Cytochrom c- Gehalt (552nm)
Na ₂ S ₂ O ₄	- H ₂ O ₂	37,2	100	-	-
Lactat	- H ₂ O ₂	27,5	74	-	-
Lactat	- Fumarat	-	-	-	4,4
Lactat+	- H ₂ O ₂	-	-	26,6	-
Fumarat					
NADH	- H ₂ O ₂	32,8	88	-	-
NADH	- Fumarat	-	-	-	13,3
NADH +	- H ₂ O ₂	-	-	24,8	-
Fumarat					
NADH +	- H ₂ O ₂	10,6	29	-	-
10 μ l HQNO					
NADH +	- H ₂ O ₂	1,8	5	-	-
25 μ l HQNO					
Succinat	- H ₂ O ₂	26,6	72	-	-
Succinat	- Fumarat	-	-	-	13,3
Succinat +	- H ₂ O ₂	-	-	25,7	-
Fumarat					

Erläuterungen siehe Tabelle XIV a! - : nicht nachgewiesen

Fortsetzung Tabelle XIV b

anaerobe Kultivierung mit Fumarat

Proben- Küvette	minus Referenz- Küvette	Cytochrom b+c- Gehalt (552nm)	Reduktions- Grad, %	Cytochrom b- Gehalt (554nm)	Cytochrom c- Gehalt (550nm)
Na ₂ S ₂ O ₄	-	138,0	100	-	-
Lactat	-	75,9	55	-	-
Lactat	-	-	-	-	-
Lactat +	-	-	-	-	38,6
Fumarat	-	-	-	37,3	-
NADH	-	78,7	57	-	-
NADH	-	-	-	-	53,8
NADH +	-	-	-	34,5	-
Fumarat	-	-	-	-	-
Succinat	-	92,5	67	-	-
Succinat	-	-	-	-	26,2
Succinat +	-	-	-	56,6	-
Fumarat	-	-	-	-	-

Erklärungen siehe Tabelle XIV b, anaerobe Kultivierung!

Tabelle XIV c: H. parainfluenzae 429 Pittman

aerobe Kultivierung

Proben- Küvette	minus	Referenz- Küvette	Cytochrom b+c- Gehalt (556 nm)	Reduktions- grad (%)
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	-	H_2O_2	26,5	100
Lactat	-	H_2O_2	25,0	94
NADH	-	H_2O_2	18,7	71
Succinat	-	H_2O_2	18,7	71

Erläuterungen siehe Tabelle XIV a!

der Chinone nach aerober und anaerober Kultivierung mit Fumarat

Tabelle XV a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

Akzeptor:		Sauerstoff Fumarat		Sauerstoff		Chinongehalt	
Substrat:		NADH ($\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1}$ gProtein $^{-1}$)		Lactat Succinat ($\mu\text{atom O} \cdot \text{min}^{-1}$ gProtein $^{-1}$)		DMK ($\mu\text{mol} \cdot$ gProtein $^{-1}$)	
A E R O B	besch. Bakterien	134,2	63,7	55,6	106,1	1,05	
	Partikel	155,0	103,9	75,8	132,2		
	lyoph. Partikel	103,8	54,9	80,0	45,2		
	extrahierte Part.	6,6	4,2	6,7	4,2		
	reinkorp.Q	96,0	11,6	151,6	138,1	0,11	
	reinkorp.DMK	72,7	55,6	124,6	77,5		
A N A E R O B	reinkorp.MK	46,5	44,2				
	reinkorp.Q+DMK	106,3	48,5	185,2	131,4		
	besch. Bakterien	143,5	176,2	31,2	134,7	4,04	
	lyoph. Partikel	140,0	67,2	53,2	41,3		
	extrahierte Part.	18,9	15,5	20,2	19,4	0,17	
	reinkorp.Q	121,5	3,5	95,1	209,7		
	reinkorp.DMK	70,1	77,4	65,7	90,1		
	reinkorp.Q+DMK	107,0	82,8	79,1	154,1		

Aerobe Kultivierung in Proteose-Pepton-Medium mit 0,04% (w/v) NADH, anaerobe Kultivierung zusätzlich mit 0,05 M Na_a-Fumarat

Tabelle XV b: H. parainfluenzae 1 Fleming

Akzeptor:	Sauerstoff Fumarat ($\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1}$ gProtein $^{-1}$)	NADH	Sauerstoff ($\mu\text{atom O} \cdot \text{min}^{-1}$ gProtein $^{-1}$)	Chinon- gehalt ($\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ gProtein $^{-1}$)
Substrat:	NADH	NADH	Lactat Succinat	DMK Q
A E R O B				
besch. Bakterien	138,9	70,8	.	2,3 1,0
lyoph.Part.	108,0	54,6	116,0	
extrahierte Part.	10,8	9,4	26,8	
reinkorp. Q	53,6	16,0	231,9	0,18 0,13
reinkorp. DMK	56,0	40,0	187,3	
reinkorp. MK	43,5	43,4	.	
reinkorp. Q+DMK	45,8	48,6	107,0	
A N A E R O B				
besch. Bakterien	145,0	129,1	374,6	0,43 0,59
lyoph. Part.	118,2	129,1	.	
extrahierte Part.	28,8	14,8	2,0	
reinkorp. Q	82,1	30,2	199,8	0,02 0,03
reinkorp. DMK	136,9	120,8	74,9	
reinkorp. Q+DMK	131,2	87,0	330,0	
			116,0	
			249,7	
			3,9	
			108,8	
			66,0	
			19,6	
			133,8	
			112,4	

Tabelle XV c: H. parainfluenzae 429 Pittman

Akzeptor:	Sauerstoff Fumarat ($\mu\text{mol NADH} \cdot \text{min}^{-1}$. gProtein $^{-1}$)	Sauerstoff ($\mu\text{atom O} \cdot \text{min}^{-1}$. gProtein $^{-1}$)			Chinon- gehalt ($\mu\text{mol} \cdot$ gProtein $^{-1}$)
Substrat:	NADH	NADH	Lactat	Succinat	Q
A E R O B					
besch. Bakterien	218,2	-	99,9	6,3	2,6
Partikel	655,4	-	274,7	16,1	.
lyoph. Part.	389,6	-	196,2	7,1	.
extrahierte Part.	60,4	-	54,4	0,8	0,54
reinkorp. Q	224,4	-	206,1	6,3	
reinkorp. DMK	231,0	31,2	91,9	4,2	
reinkorp. MK	129,3	40,9	32,5	3,6	
reinkorp. Q+DMK	338,4	22,5	158,8	5,4	

-107-

Erläuterungen siehe Tabelle XV a!

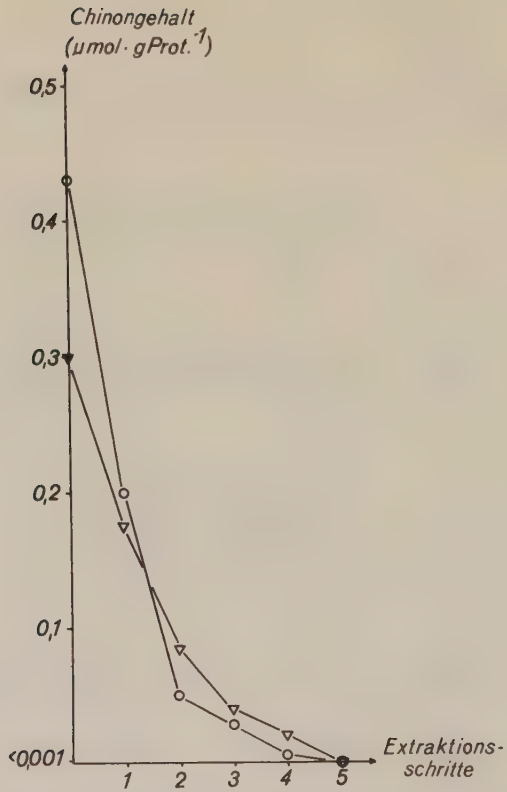


Abb.1: Extraktion der Chinone von H. parainfluenzae
1 Fleming mit Pentan

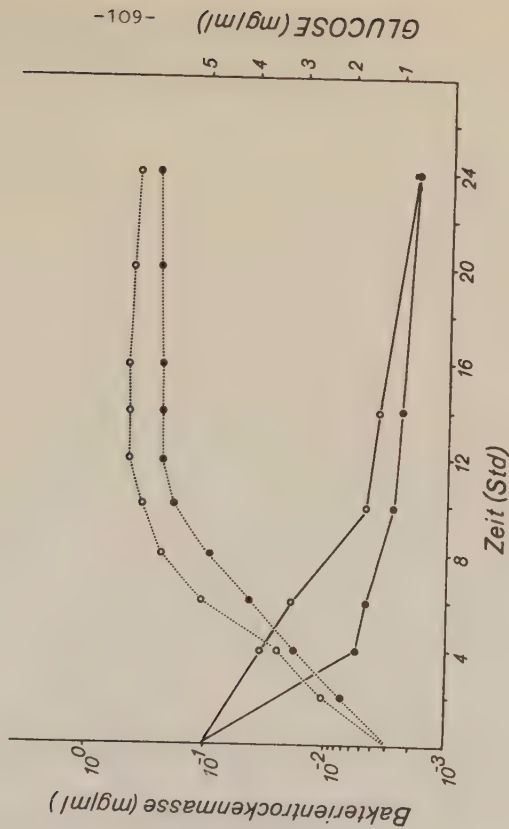
— ○ — Desmethylnachinon

— △ — Ubichinon

Abb. 2 a-d: Glucoseabbau und Massenzuwachs einiger Haemophilus-Stämme bei Kultivierung in Proteose-Pepton-Medium mit Sauerstoff bzw. Fumarat als terminaler Elektronenakzeptor

Abb. 2 a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

- Glucosegehalt, aerobe Kultivierung
- Glucosegehalt, anaerobe Kultivierung mit Fumarat
- Massenzuwachs, aerobe Kultivierung
- Massenzuwachs, anaerobe Kultivierung mit Fumarat



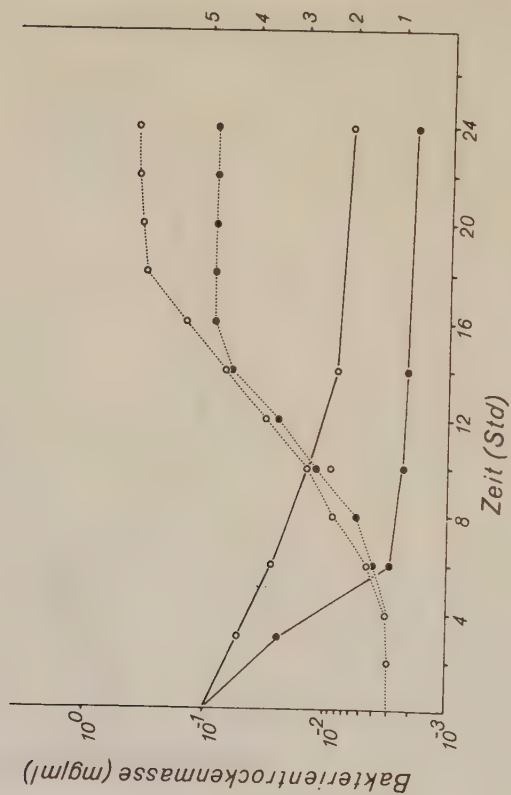


Abb. 2 b: H. parainfluenzae 1 Fleming

Erläuterungen siehe Abb. 2 a!

Abb. 2 c: H. parainfluenzae 429 pitt-
man

Erläuterungen siehe Abb. 2 a!

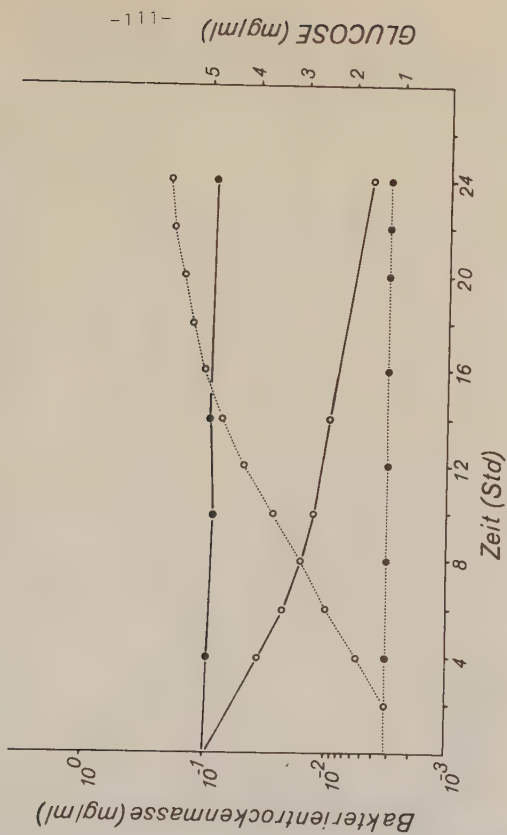


Abb 2 d: H. aegyptius 180 a Pittman

Erläuterungen siehe Abb 2 a!

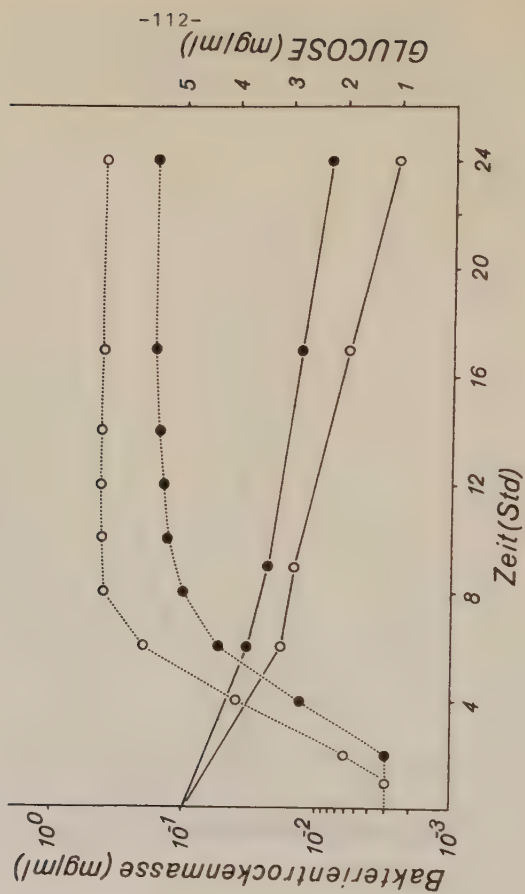
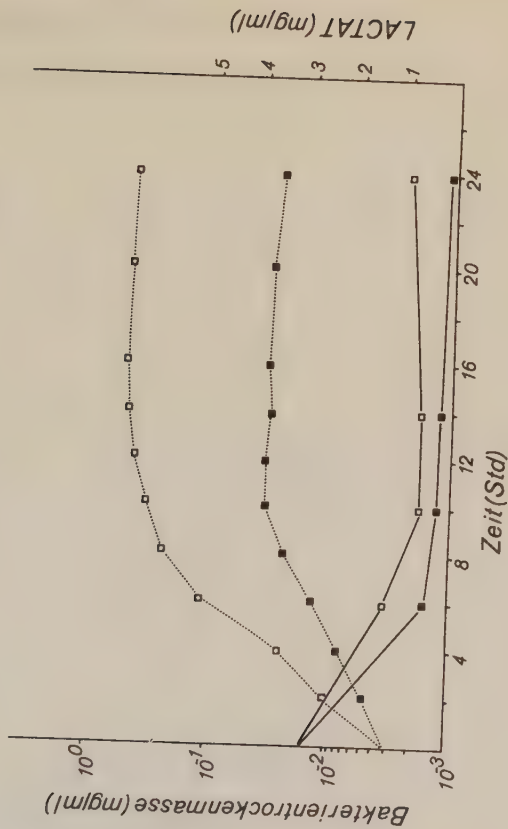


Abb. 3a: u. d. Lactatabbau und Massenzuwachs, einiger Haemophilus-Stämme bei Kultivierung in Proteose-Pepton-Medium mit Sauerstoff bzw. Fumarat als Elektronenakzeptor

Abb. 3a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

- Lactatgehalt, aerobe Kultivierung
- Lactatgehalt, anaerobe Kultivierung mit Fumarat
- Massenzuwachs, aerobe Kultivierung
- Massenzuwachs, anaerobe Kultivierung mit Fumarat



1. $u_1, u_2, \dots, u_n$ 是 V 的一组基， V 是 n 维向量空间。

2. $u_1, u_2, \dots, u_n$ 是 V 的一组基， V 是 n 维向量空间。

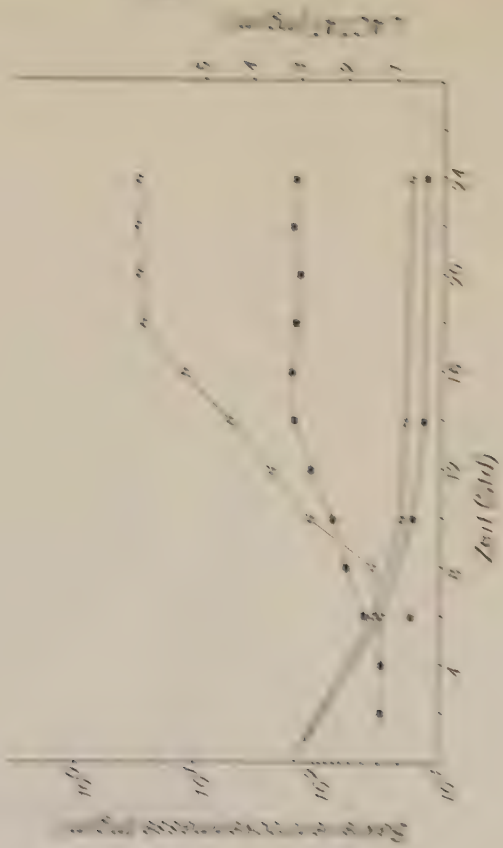
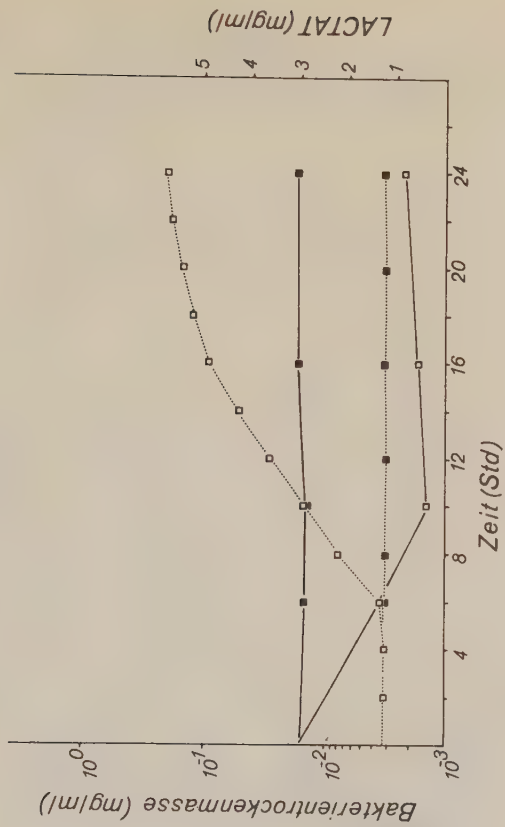


Abb 3 c: H. parainfluenzae 429 Pitt-
man

Erläuterungen siehe Abb 3 a!



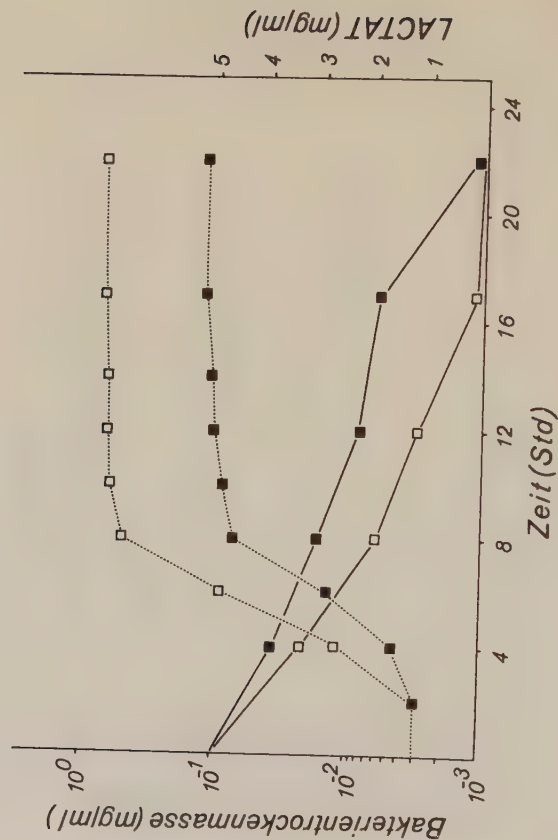
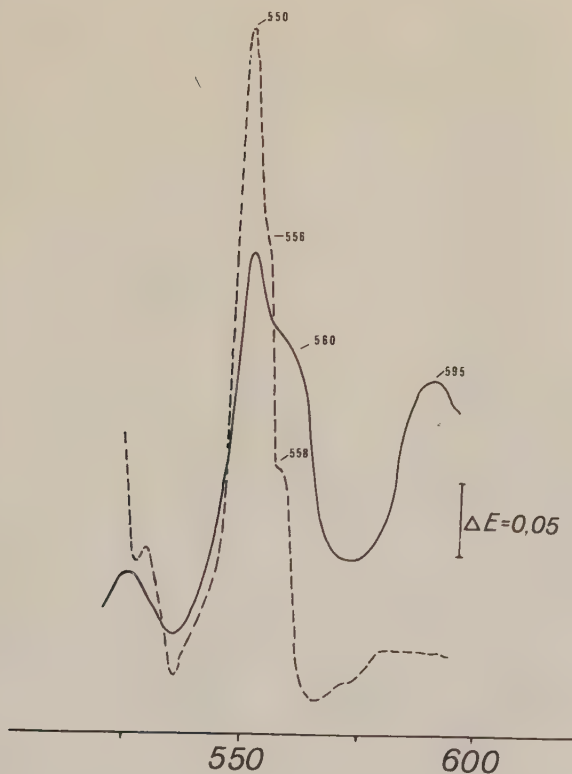


Abb. 3 d: H. aegyptius 180a Pittman

Erläuterungen siehe Abb 3 a!

Abb. 4-6: Auflösung des α -Summenmaximums der b- und c-ty-
pischen Cytochrome im Tieftemperatur-Differenz-
spektrum

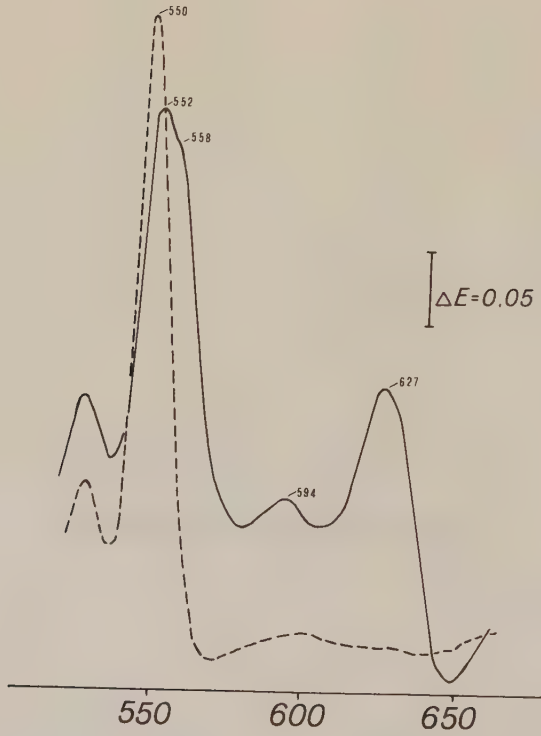
Abb. 4 : H. parainfluenzae 1 Fleming



— aerob: 22 mg Protein

--- anaerob + Fumarat: 22 mg Protein

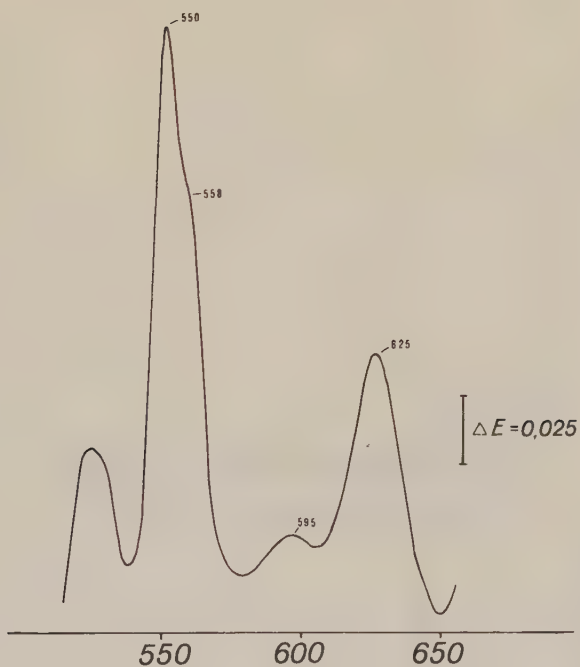
Abb. 5: H. influenzae RAMC 18 Bensted



— aerob: 20 mg Protein

--- anaerob + Fumarat: 10 mg Protein

Abb. 6 : H. parainfluenzae 429 Pittman



_____ aerob: 20 mg Protein

Abb. 7 a-c: Wachstum einiger Haemophilus-
Stämme mit den terminalen Akzeptoren Sauer-
stoff bzw. Fumarat

Abb. 7 a: H. influenzae RAMC 18 Bensted

- aerobe Kultivierung
- anaerobe Kultivierung
- anaerobe Kultivierung mit
Fumarat

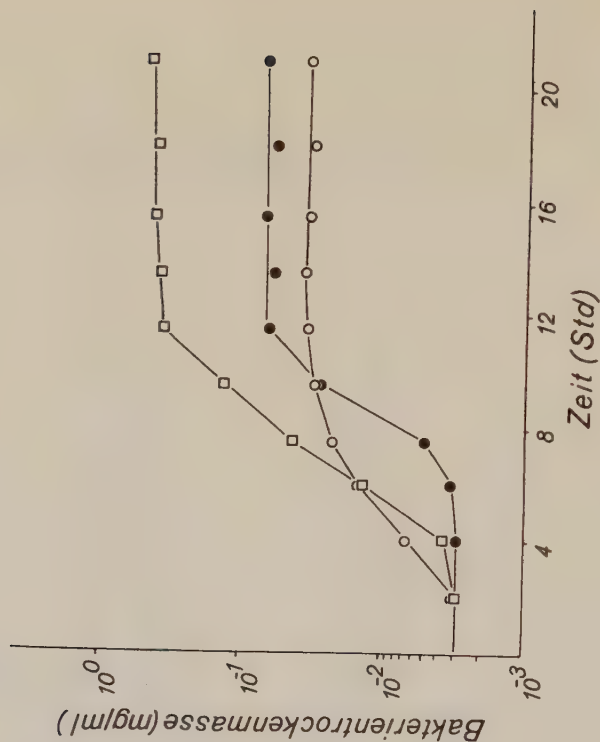
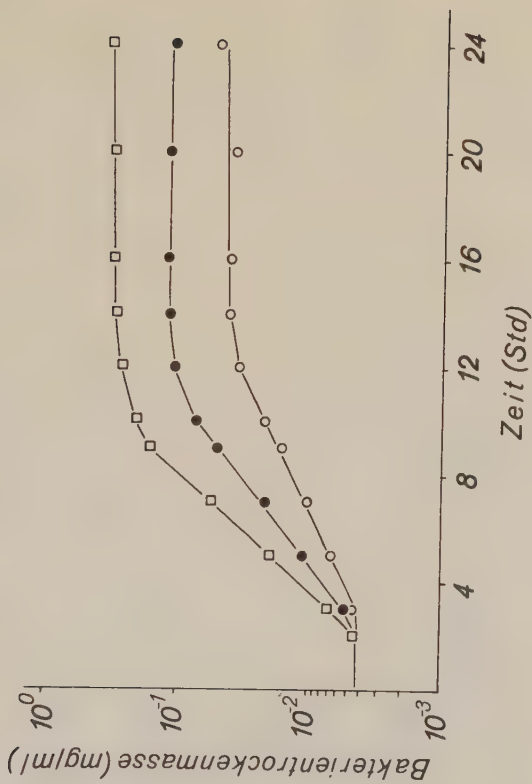


Abb. 7 b: H. parainfluenzae 1 Fleming

Erläuterungen siehe Abb. 7 a!



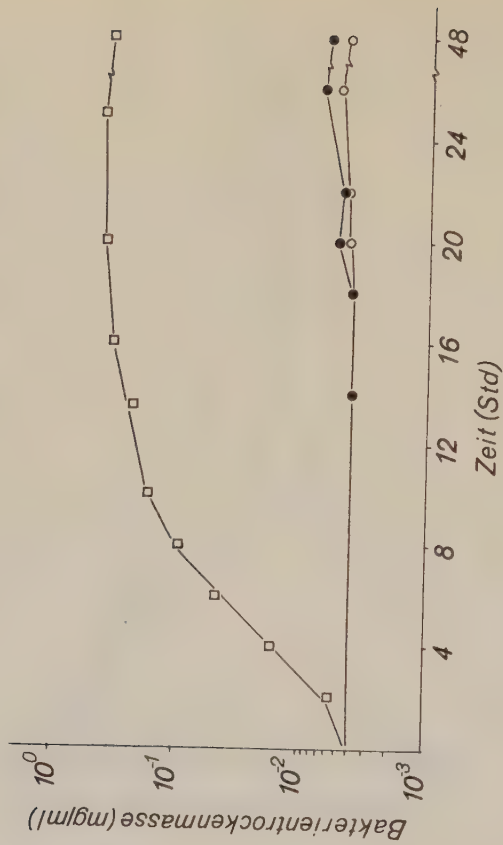


Abb 7 c: H. parainfluenzae 429 Pittman

Erläuterungen siehe Abb 7 a!

Abb. 8: Wachstum, NADH-Fumarat-Reduktase, NADH-Oxydase, Chinon- und Cytochromgehalt von H. influenzae RAMC 18 Bensted nach Kultivierung in verschiedenen Haematinkonzentrationen

Kultivierung in Proteose-Pepton-Medium mit 0,05 (w/v) Glucose und 1% (v/v) NAD unter aeroben Bedingungen. Die Abszisse zeigt den Haematingehalt in $\mu\text{mol/ml}$; die Ordinaten: A: Ertrag in mg/ml , B: DMK-Gehalt in $\mu\text{mol/g Protein}$, C: Cytochrom b_{558} -Gehalt in $\Delta\text{E/cm.g Protein}$, D: Atmung mit Sauerstoff oder Fumarat in $\mu\text{mol/min.g Protein}$.

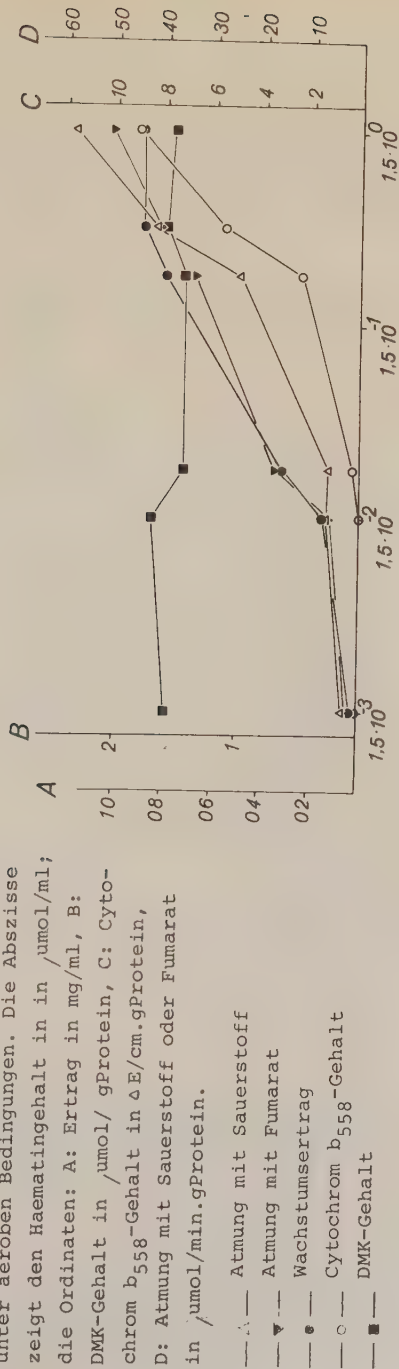
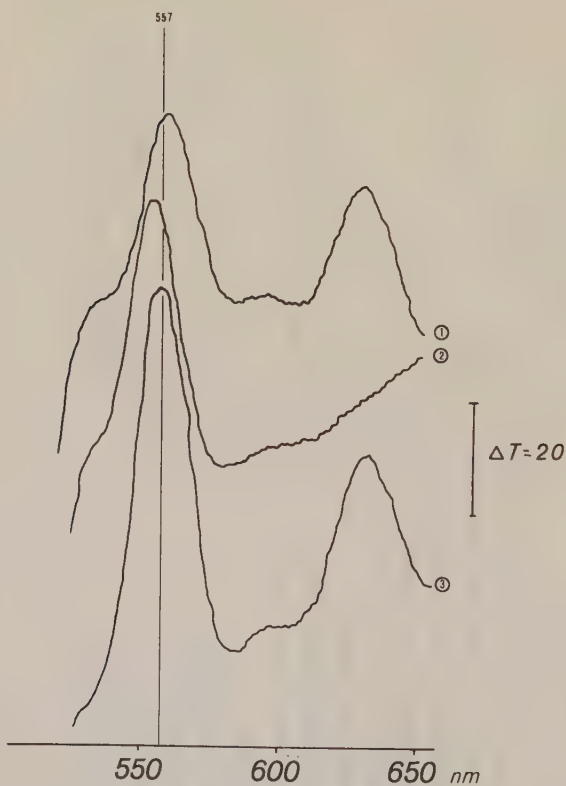


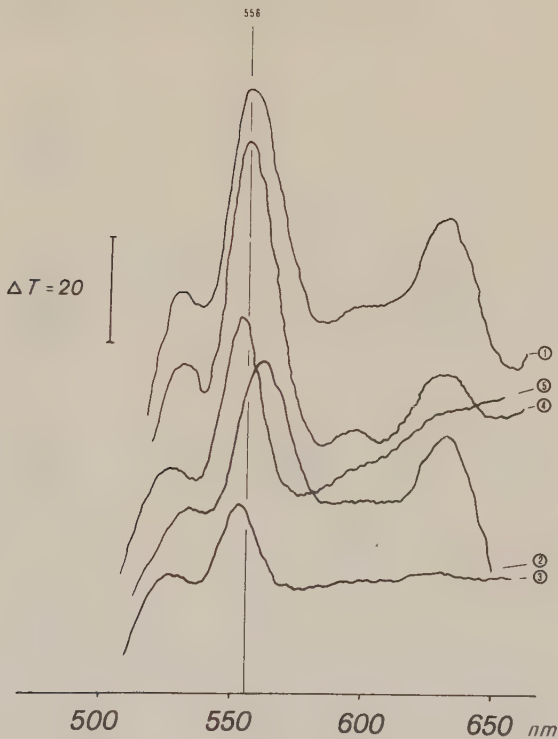
Abb. 9-11: Teilnahme der Cytochrome am Elektronentransport bei der Veratmung verschiedener Substrate mit Sauerstoff oder Fumarat, dargestellt durch Cytochrom-Differenzspektren

Abb.9: H. influenzae RAMC 18 Bensted



- (1) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ minus H_2O_2
- (2) $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ minus Fumarat
- (3) NADH (anaerob) + Fumarat minus H_2O_2

Abb. 10: H. parainfluenzae 1 Fleming



- ① $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ minus H_2O_2
- ② NADH (anaerob) + Fumarat minus H_2O_2
- ③ NADH (anaerob) minus Fumarat
- ④ NADH (anaerob) minus Sauerstoff
- ⑤ $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ minus Fumarat

Abb. 11: H. parainfluenzae 429 Pittman

- 1 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ minus H_2O_2
- 2 NADH (anaerob) minus H_2O_2
- 3 NADH (anaerob) minus Fumarat
- 4 NADH (anaerob) + Fumarat minus H_2O_2

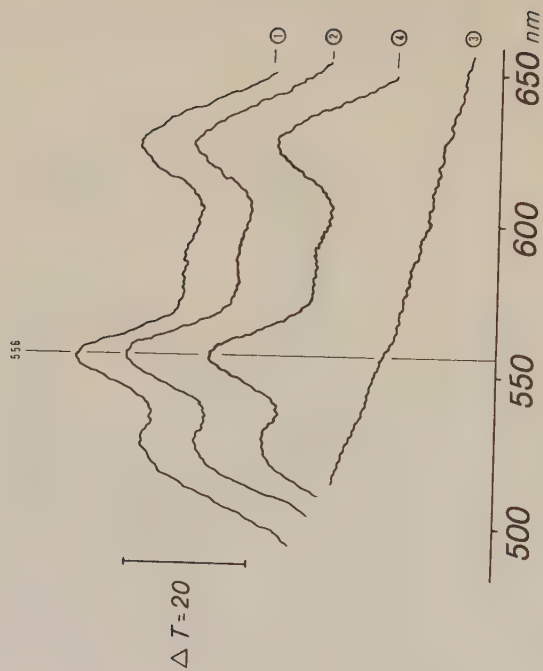
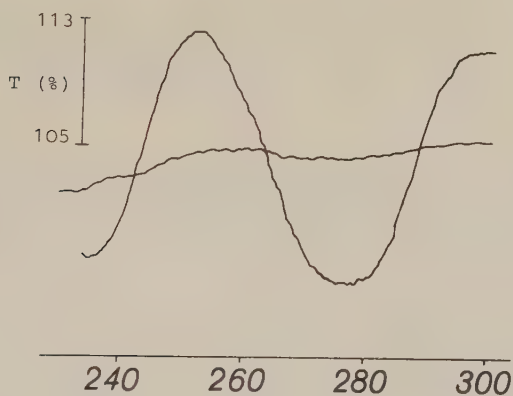


Abb. 12: Differenzspektrum eines nicht identifizierten
Chinons von H. parainfluenzae 429 Pittman



Literature references

ALLANSON, R. S.

The Streptococcus Group. In R. L. Davis (ed.), Bacterial And Mycotic Infections of Man, 3rd ed., p. 470-486, Lippincott, Philadelphia, 1968

ASANO, A., HODGE, A.F.:

The Properties of the Non-phosphorylative Electron Transport Phase Systems of Mycobacterium 10191 Biochem. Biophys. Acta 74 (1965) 121-126

ATCC:

The American Type Culture Collection Catalogue of Strains, 10th ed., Rockville, 1972

ATKINSON, D.E.:

Regulation of Enzyme Function

Ann. Rev. Microbiol. 23 (1969) 47-68

BALL, W. S.:

Characterization of hemophilus somni new species, a Microorganism Isolated from Infectious Thromboembolic Meningoencephalomyelitis of Cattle
Ph. D. Dissertation, Kansas State University, Manhattan, 1964, cited in: CHRISTEN, R.B., FANCHER, F.J., KINKER, J.B., STARR, S.L., SOWARD, C.:

Survey of Diseases of Feeder Cattle for Hemophilus somni and Other Selected Bacteria

J. Amer. Vet. Med. Ass. 163 (1973) 870-873

BARBOUR, S. S., STOFF, J.W.:

Microorganisms from the Late Proterozoic of Central Africa

Science 190 (1965) 337-339

BARTLE, R. J.:

Bacterial Cytochromes

Ann. Rev. Microbiol. 22 (1968) 181-200

BAUM, R.H., DOLIN, M.I.:

Isolation of a New Napthoxyquinone from *Escherichia coli*
faecalis 10 C1

J. biol. Chem. 238 (1963) 4109-4111

BEERMANN, B.:

Untersuchungen zur Funktion des Coenzyme-Uberschüsses
in der Atmungskette von Vertretern der Familie der
Enterobacteriaceae und der Gattung Enterobacter

Diplomarbeit, Marburg, 1975

BELJANSKI, M.:

Isolement de mutants d'Escherichia coli streptomycin-
résistants dépourvus d'enzymes respiratoires. Action
de l'hémine sur la formation de ces enzymes chez le
mutant H₇

Compt. rend. Acad. Sci. 240 (1955) 374-377

BENZIMAN, M., GOLDHAMER, H.:

The Role of Ubiquinone in the Respiratory Chain of
Acetobacter xylinum

Biochem. J. 108 (1968) 311-316

BERGEY, D.H., HARRISON, F.C., BREED, R.S., HAMMER, B.W.,
HUNTOON, F.M.:

Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed.,
p. 1-462, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1923

BERGMEYER, H.U., BERNT, E.:

Malat-Dehydrogenase, in H.U. Bergmeyer, Methoden der
enzymatischen Analyse, 3. Aufl., p. 649-653, Verlag
Chemie, Weinheim 1974

Bergmeyer, H.U., BERNT, E.:

Lactat-Dehydrogenase, ebenda, p. 607-612

BERNS, K.I., THOMAS, C.A.:

Isolation of High Molecular Weight DNA from Haemophilus
influenzae

J. mol. Biol. 11 (1965) 476-490

...
...
...
...

...
...
...
...

...
...
...

...
...

...
...

...
...
...

...
...
...

...
...
...

...
...
...

CHAMBERLAIN, R. J.

The Bacteriology and Pathology of the Chick
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 22 (1897) 601-604

CHAMBERLAIN, R. J.

The Role of Bacteria in the Pathogenesis of the
Typhoid-like Disease in Chickens
Z. Hyg. 36 (1901) 23-44

CHAMBERLAIN, R. J.

Zur Biologie der Influenzabakterien
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. 32 (1902) 692-694

CHAMBERLAIN, R. J., LACROIX, J. J.

The Effect of Growth Conditions on Oxidative and
Fermentative Activity in *Streptococcus aureus*
J. gen. Microbiol. 23 (1962) 531-535

CHAMBERLAIN, R. J., LACROIX, J. J.

Cytochrome as a Guide to Classifying Bacteria.
Journal of Bacteriology 100 (1963) 502-504
Nature (London) 226 (1963) 502-504

CHAMBERLAIN, R. J.

The Bacteriology of the Chick. A Manual of Bacterial Culture
with Special Reference to Haemophilic Bacilli I.
J. Inf. Dis. 21 (1917) 332-403

CHAMBERLAIN, R. J.

The Bacteriology of the Chick. II. "Bacillus"
or Symplicia Phenomenon of Pfeiffer's Bacillus
J. Inf. Dis. 23 (1921) 173-186

CHAMBERLAIN, R. J., JUNGHERMANN, K., THAYER, R. K.

The Bacteriology of the Chick. A Manual of Bacterial Culture
with Special Reference to Haemophilic Bacilli II.
J. Inf. Dis. 4 (1970) 153-173

CHAMBERLAIN, R. J., LACROIX, J. J., STUART, R. G.

A Haemophilic Bacillus as the Cause of an Infectious
Disease (Ornithosis) of Poultry
Nucleus Island Agr. Exp. St. Bull. 244 (1934) 1-12

DE LEY, J.:

Molecular Data in Microbial Systematics, in Systematic Biology, Proceedings of an International Conference, National Academy of Science, p. 248-268, Washington, 1969

DE VRIESE, L.A.:

Hemin-dependent Mutant Isolated from Methicillin-resistant Staphylococcus aureus Strains
Ant. v. Leeuwenhoek 39 (1973) 33-40

DIERNHOFER, K.:

Haemophile Bakterien im Geschlechtstrakt des Rindes
Wien. Tierärztl. Monatsschr. 36 (1949) 582-588

DOSS, M., MANNHEIM, W.:

Protoporphyrin und Haemin in Kulturfiltraten von Achromobacter metalcaligenes
Experientia 23 (1967) 31-38

DUNPHY, P.J., PHILLIPS, P.G., BRODIE, A.F.:

Separation and Identification of Menaquinone from Microorganisms
J. Lipid Res. 12 (1971) 442-449

ENGLESBERG, E., GIBOR, A., LEVY, J.B.:

Adaptive Control of Terminal Respiration in Pasteurella pestis
J. Bacteriol. 68 (1954) 146-151

ENGLESBERG, E., LEVY, J.B., GIBOR, A.:

Some Enzymatic Changes Accompanying the Shift from Anaerobiosis to Aerobiosis in Pasteurella pestis
J. Bacteriol. 68 (1954) 178-185

Enzyme Nomenclature:

Recommendations (1972) of the 'Commission on Biochemical Nomenclature' on the Nomenclature and Classification of Enzymes, together with their Units and the Symbols of Enzyme Kinetics, Elsevier Publ., Amsterdam, 1973

ERNSTER, L., LEE, I.-Y., NORLING, B., PERSSON, B.:
Studies with Ubiquinone-depleted Submitochondrial
Particles

Europ. J. Biochem. 9 (1969) 299-310

FAUST, P.J., VANDEMARK, P.J.:

Phosphorylation Coupled to NADH Oxidation with Fumarate
in Streptococcus faecalis 10 C1

Arch. Biochem. Biophys. 137 (1970) 392-398

FILDES, P.:

The Nature of the Effect of Blood-pigment upon the
Growth of Bacillus influenzae

Brit. J. Exp. Path. 2 (1921) 16-25

FISCHER, P.:

Die Dynamik der Atmungskette bei Achromobacter mucosus
(Acinetobacter calcoaceticus). Einfluß des Gelöstsauer-
stoffkonzentration und des Substrats auf Cytochrome
und respiratorische Chinone

Med. Dissertation, Marburg, 1972

FUJITA, A., KODAMA, J.:

Untersuchung über Atmung und Gärung. III. Mitteilung:
Über Cytochrom und das sauerstoffübertragende Ferment,
sowie die Atmungshemmung der pathogenen Bakterien durch
CO und HCN

Biochem. Z. 273 (1934) 186-197

GARDNER, H.L., DUKES, C.D.:

Haemophilus vaginalis: a Newly Defined Specific Infection,
Previously Classified as "Nonspecific" Vaginitis

Amer. J. Obstet. Gynecol. 69 (1955) 962-976

GHON, A., PREYSS, v. W.:

Studien zur Biologie des Influenzaebacillus

Zbl. Bakteriol. Abt. I Orig. 35 (1904) 531-537

GHON, A., PREYSS, v. W.:

Studien zur Biologie des Influenzaebacillus

Zbl. Bakteriol. Abt. I Orig. 32 (1902) 90-105

LEWIS, R.J., and L.P. :

Vitamin K Compounds in Bacteria that are Obligate Anaerobes

Science 74 (1944) 1207-1208

LEWIS, R., and L.P. :

Studies on the Haemophilus Group of Organisms.

Quantitative Aspects of Growth on Various Porphin Compounds

J. gen. Physiol. 31 (1947) 103-117

LINGGREN, W., and SLENN, F. :

Cofactor I and Other Pyridinium Compounds as
-factor for Haemophilus influenzae and Haemophilus
parainfluenzae

J. Bacteriol. 47 (1944) 535-536

LOREN, J., and ROSS, J.W. :

The Practical Application of the Direct Oxidase Reaction
in Bacteriology

J. Path. Bact. 38 (1938) 185-190

LOVELL, W., and GIBSON, J.B. in JALL, J., LOUGHEAD, J. :

Presence of Cytochrome and Hemocyanine in Clostridium
formosanum and Clostridium thermoceticum

J. Bacteriol. 121 (1973) 325-326

ORANICK, S., and GILDER, H. :

The Structure, Function and Inhibitory Action of Por-
phyrins

Science 90 (1945) 540

ORANICK, S., and GILDER, H. :

The Photocopying Requirements of Haemophilus influenzae
and some Functions of the [vinyl] and Propionic Acid Side
Chains of Heme

J. gen. Physiol. 30 (1946) 1-13

GRASSBERGER, R.:

Beiträge zur Bakteriologie der Influenzae

Z. Hyg. 25 (1897) 453-476

GRAY, C.T., WIMPENNY, J.W.T., HUGHES, D.E., MOSSMANN, M.:

Structural and Functional Shifts between the Aerobic and Anaerobic States

Biochim. Biophys. Acta 117 (1966) 22-32

GRAY, C.T., WIMPENNY, J.W.T., MOSSMANN, M.:

Effect of Aerobiosis, Anaerobiosis and Nutrition on the Formation of the Krebs Cycle Enzymes in Escherichia coli

Biochim. Biophys. Acta 117 (1966) 33-41

HALL, J.B.:

Evolution of the Prokaryotes

J. theor. Biol. 30 (1971) 429-454

HANSON, R.S., COX, D.P.:

Effect of Different Nutritional Conditions on the Synthesis of Tricarboxylic Acid Cycle Enzymes

J. Bacteriol. 93 (1967) 1777-1787

HATCHIKIAN, E.C.:

On the Role of Menaquinone-6 in the Electron Transport of Hydrogen:Fumarate Reductase in the Strict Anaerobe Desulfovibrio gigas

J. gen. Microbiol. 81 (1974) 261-266

HATCHIKIAN, E.C., LE GALL, J.:

Evidence for the Presence of a b-type Cytochrome in the Sulfate Reducing Bacterium Desulfovibrio gigas, and Its Role in the Reduction of Fumarate by Molecular Hydrogen

Biochim. Biophys. Acta 267 (1972) 479-484

• HAUDUROY, P., EHRINGER, G., URBAIN, A., GUILLOT, G., MAGROU, J.:

Dictionnaire des bactéries pathogènes, p. 1-597, Masson & Co., Paris, 1937

HOLLÄNDER, R., MANNHEIM, W.:

Characterization of Hemophilic and Related Bacteria by
Their Respiratory Quinones and Cytochromes

Int. J. Syst. Bacteriol. 25 (1975) 102-107

HUGH, R., LEIFSON, E.:

The Taxonomic Significance of Fermentative Versus Oxidative Metabolism of Carbohydrates by Various Gram-negative Bacteria

J. Bacteriol. 66 (1953) 24-26

JACOBSEN, B.K., DAM, H.:

Vitamin K in Bacteria

Biochim. Biophys. Acta 40 (1960) 211-216

JEDISS, R.:

Cytochrome und respiratorische Chinone der Enterobacteriaceae

Med. Dissertation Marbur, 1973

JENSEN, J., THOFERN, E.:

Chlorhämmin (Ferroporphyrinchlorid) als Bakterienwuchsstoff I

Z. Naturforsch. 8b (1953) 599-603

JONES, H.E.:

Cytochromes and Other Pigments of Dissimilatory Sulphate-reducing Bacteria

Arch. Microbiol. 84 (1972) 207-224

JONES, C.W., REDFEARN, E.R.:

The Cytochrome System of Azotobacter vinelandii

Biochim. Biophys. Acta 143 (1967 a) 340-353

JONES, C.W., REDFEARN, E.R.:

Preparation of Red and Green Electron Transport Particles from Azotobacter vinelandii

Biochim. Biophys. Acta 143 (1967 b) 354-362

KAUFFMANN, F.:

Enterobacteriaceae, 2. Aufl., Munksgaard, Kopenhagen,
1954

KEILIN, D.:

On Cytochrome, a Respiratory Pigment, Common to Animals,
Yeast and Higher Plants

Proc. Roy. Soc. B 98 (1925) 312-339

KENNEDY, P.C., FRAZIER, L.H., THEILEN, G.M.,

BIBERSTEIN, E.L.:

A Septicemic Disease Caused by Haemophilus agni (New
Species)

Am. J. Vet Res. 19 (1958) 645-654

KERSTERS, K., DE LEY, J.:

The Occurrence of Entner-Doudoroff-Pathway in Bacteria

Ant. v. Leeuwenhoek 34 (1968) 393-408

KHAIRAT, O.:

Endocarditis due to a New Species of Haemophilus

J. Path. Bacteriol. 50 (1940) 497-505

KING, J.:

6-Phosphogluconate-Dehydrogenase, in H.U. Bergmeyer (ed),
Methoden der enzymatischen Analyse 3. Aufl., p.668-672,
Verlag Chemie, Weinheim, 1974

KNOWLES, C.J., REDFEARN, E.R.:

Ubiquinone in the Electron-Transport System of Azoto-
bacter vinelandii

Biochem. J. 99 (1966) 33P-34P

KNOWLES, C.J., REDFEARN, E.R.:

The Effect of Combined-Nitrogen Sources on the Synthesis
and Function of the Electron Transport System of Azoto-
bacter vinelandii

Biochim. Biophys. Acta 162 (1968) 348-355

KRAMPITZ, L.O.:

Cyclic Mechanism of Terminal Oxidations, in
The Bacteria Vol. II, I.C. Gunsalus & R.Y. Stanier
(eds), p. 209-256, Academic Press, New York, 1961

KRISTENSEN, M.:

Investigations into the Occurrence and Classification
of the Hemoglobinophilic Bacteria, Levin & Munksgaard,
Kopenhagen, 1922

KRÖGER, A.:

mdl. Mitteilung über Extraktion und Reinkorporation
von Chinonen, 1973

KRÖGER, A.:

Electron Transport Phosphorylation Coupled to Fumarate
Reduction in Anaerobically Grown Proteus rettgeri
Biochim. Biophys. Acta 347 (1974) 273-289

KRÖGER, A., DADÁK, V.:

On the Role of Quinones in Bacterial Electron Trans-
port. The Respiratory System of Bacillus megaterium
Eur. J. Biochem. 11 (1969) 328-340

KRÖGER, A., KLINGENBERG, M.:

Quinones and Nicotinamide Nucleotides Associated with
Electron Transfer
Vitamins & Hormones 28 (1970) 533-574

KRÖGER, A., DADÁK, V., KLINGENBERG, M., DIEMER, F.:

On the Role of Quinones in Bacterial Electron Trans-
port. Differential Role of Ubiquinone and Menaquinone
in Proteus rettgeri

LAPAGE, S.P.:

Haemophilus vaginalis, in Bergey's Manual of Deter-
minative Bacteriology 8th ed., R.E. Buchanan & N.E.
Gibbons (eds), p. 368-370, William & Wilkins Co.,
Baltimore, 1974

LASCELLES, J.:

Tetrapyrrole, Biosynthesis and Its Regulation

Benjamin Inc., Amsterdam, 1964

LENOFF, H.M., NICHOLAS, J.D., KAPLAN, N.O.:

Effects of Oxygen, Iron and Molybdenum on Routes of
Electron Transfer in Pseudomonas fluorescens

J. biol. Chem. 220 (1956) 983-994

LESTER, R.L., CRANE, F.L.:

The Natural Occurrence of Coenzyme Q and Related
Compounds

J. biol. Chem. 234 (1959) 2169-2173

LESTER, R.L., WHITE, D.C., SMITH, S.L.:

The 2-Demethyl-Vitamin K₂'s. A New Group of Naphtho-
quinones Isolated from Haemophilus parainfluenzae

Biochem. 3 (1964) 949-954

LIGHTBOWN, J.W., JACKSON, F.L.:

Inhibition of Cytochrome Systems of Heart Muscle and
Certain Bacteria by the Antagonists of Dihydrostrepto-
mycin: 2-Alkyl-4-Hydroxyquinoline N-Oxides

Biochem. J. 63 (1956) 130-137

LWOFF, A.:

Revision et démembrement des Hemophilae, le genre
Moraxella nov. gen.

Ann. Inst. Pasteur (Paris) 62 (1939) 168-176

LWOFF, A., LWOFF, M.:

(1) Studies on Codehydrogenase. Nature of Growth Factor V
Proc. Roy. Soc. B 122 (1937 a) 352-359

LWOFF, A., LWOFF, M.:

(2) Studies on Codehydrogenase. Physiological Function
of Growth Factor V

Proc. Roy. Soc. B 122 (1937 b) 360-373

LWOFF, A., LWOFF, M.:

Rôle physiologique de l'hémine pour H. influenzae
Pfeiffer

Ann. Inst. Pasteur 59 (1937 c) 129-136

MANNHEIM, W.:

Limitierende Faktoren in Mischkulturen eines obligaten
Aerobiers (Achromobacter metalcaligenes) mit Haemophilus
influenzae resp. Anaerobiern

Path. Microbiol. 29 (1966) 341-365

MAROC, J., AZERAD, R., KAMEN, M.D., LE GALL, J.:

Menaquinone (MK-6) of the Sulfat-Reducing Obligate
Anaerobe Desulfovibrio

MARQUEZ, E.D., BRODIE, A.F.:

Electron Transport in Halophilic Bacteria: Involvement
of a Menaquinone in the Reduced Nicotinamide Adenine
Dinucleotide Oxidative Pathway

J. Bacteriol. 103 (1970) 261-263

MASSEY, U.:

Fumarase, in S.P. Colowick and N.O. Kaplan (eds),
Methods in Enzymology Vol. I, p. 729-735, Academic Press,
New York, 1955

MEYER, D.J., JONES, C.W.:

Distribution of Cytochromes in Bacteria: Relationship
to General Physiology

Int. J. Syst. Bacteriol. 23 (1973) 459-467

MILES, D.G., ANTHONY, H.D., DENNIS, S.M.:

Haemophilus somnifer (n.sp.) Infection in Sheep

Am. J. Vet. Res. 33 (1972) 431-435

MITCHELL, C.A.:

Haemophilus ovis (nov.spec.) as the Cause of a Specific
Disease in Sheep

J. Amer. Vet. Med. Ass. 68 (1925) 8-18

MURRAY, E.G.D.:

Parvobacteriaceae, in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 5th ed., Bergey et al. (eds), p. 289-310, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1939

OLSEN, O.:

Untersuchungen über den Pfeifferschen Influenzabazillus während der Grippepandemie 1918-1920

Zbl. Bakteriол. Abt. I Orig. 85 (1920) 12-27

ORNSTON, L.N.:

Regulation of Catabolic Pathways in Pseudomonas
Bacteriol. Rev. 35 (1971) 87-116

PARK, I.W., DE LEY, J.:

Ancestral Remnants in Deoxyribonucleic Acids from
Pseudomonas and Xanthomonas
Ant. v. Leeuwenhoek 33 (1967) 1-16

PFEIFFER, R.:

Vorläufige Mitteilung über den Erreger der Influenzae
Dtsch. Med. Wschr. 18 (1892) 28

PFEIFFER, R.:

Die Aetiologie der Influenzaerkrankheit
Z. Hyg. Infekt. Kr. 13 (1893) 357-386

PITTMAN, M.:

A Classification of the Haemolytic Bacteria of the
Genus Haemophilus: Haemophilus haemolyticus Bergey
et al. and Haemophilus parahaemolyticus Nov. Spec.
J. Bacteriol. 65 (1953) 750- 751

PITTMAN, M., DAVIS, D. J.:

Identification of the Koch-Weeks Bacillus (H. aegyptius)
J. Bacteriol. 59 (1950) 413-426

POLGLASE, W.J., PUN, W.T., WITHAAR, J.:

Lipoquinones of Escherichia coli
Biochim. Biophys. Acta 118 (1966) 426-429

今日(1944)年、東京、昭和十九年、八月

「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、

「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、

「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、

「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、

「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、

「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、

「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、
「日本」の「大東亜」の「戦争」は、

SCOTT, W.M.:

The Influenza-group of Bacteria, in A System of Bacteriology in Relation to Medicine, p. 326-387, London, 1929

SCRUTTON, M.C.:

Assay of Enzymes of CO₂-Metabolism, in Methods in Microbiology Vol 6 A, J.R. Norris & D.W. Ribbons (eds), p. 479-541, Academic Press, 1971

SINCLAIR, P.R., WHITE, D.C.:

Effect of Nitrate, Fumarate and Oxygen on the Formation of the Membranbound Electron Transport System of Haemophilus parainfluenzae
J. Bacteriol. 101 (1970) 365-372

SINGER, T.P.:

Evolution of the Respiratory Chain and of Its Flavoproteins, in Biochemical Evolution and the Origin of Life, E.Schoffeniels (ed), p. 203-235, North-Holland Publishing Co., Amsterdam, 1971

SMITH, L.:

Bacterial Cytochromes

Bacteriol. Rev. 18 (1954) 106-130

SMITH, L.:

Cytochrome Systems in Aerobic Electron Transport, in The Bacteria Vol. II, Metabolism, I.C. Gunsalus & R.Y. Stanier (eds), p. 365-396, Academic Press, New York, 1961

SMITH, L.:

The Respiratory Chain System in Bacteria, in Biological Oxidations, T.P. Singer (ed), p. 55-122, Interscience Publ. Wiley, New York, 1968

SMITH, L., SMITH, P.C.:

Structure of the Respiratory Chain as Indicated by Studies with *Stomaphysalis pallidipennis*
J. Biol. Chem. 237 (1962) 1337-1341

SMITH, L., SMITH, P.C., SINCLAIR, F., CHANOS, S.:

Rapid Reactions of Cytochromes of *Stomaphysalis pallidipennis* Triggered on Addition of Substrate or Oxygen
J. Biol. Chem. 245 (1970) 5094-5100

SMITH, W., HALL, J.H., O'CALLAGHAN, C.:

Iron Utilization and Nitrate Reduction by *Stomaphysalis pallidipennis*
J. Path. Bacteriol. 65 (1955) 224-234

SNEDECOR, G.G., JOHNSON, G.G.:

Numerical Taxonomy of *Stomaphysalis* and Related Bacteria
Int. J. Syst. Bacteriol. 23 (1973) 405-413

SALESKOC, S.F., SKIFFIN, F.J., FOLLOIS, S.S.:

A New Bacterium (*Stomaphysalis glabra* n. sp.) from Liver Disease of Trout
J. Bacteriol. 54 (1950) 694-710

SPITZER, G.:

Cytochromespektroskopie von Bakterien als Hilfsmittel zur Klärung taxonomischer Fragen.

1. Mittl.: Entwicklung und Beschreibung einer Methode zur Ermittlung des Redox- und Cytochromcytochromespektrums von Suspensionen lebender Bakterienzellen
Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A 226 (1974) 524-540

Spitzer, G.:

2. Mittl.: Die Redox- und Cytochromcytochromespektren von Proteobakterien, Actinobakterien, Nocardien, Pasteurellen und Vibriosen, sowie Acidobakterien, Alkaligenen- und Actinobacterien

Zbl. Bakt. Abt. I Orig. A 226 (1974) 541-553

SPICHER, G.:

3. Mittlg.: Die Cytochromabsorptionsspektren der untersuchten Bakterienstämme und ihre Beziehung zur Taxonomie

Zbl. Bakteriol. Abt. I Orig. A 228 (1974) 317-368

STRAAT, P.A., NASON, A.:

Characterization of Nitrate Reductase from the Chemototroph Nitrobacter agilis

J. biol. Chem. 240 (1965) 1412-1426

STANIER, R.Y., PALLERONI, N.J., DOUDOROFF, M.:

The Aerobic Pseudomonads: A Taxonomic Survey

J. gen. Microbiol. 43 (1966) 159-271

STRASTERS, K.C., WINKLER, K.C.:

Carbohydrate Metabolism of Staphylococcus aureus

J. gen. Microbiol. 33 (1963) 213-229

SWANK, R.T., BURRIS, R.H.:

Restoration by Ubiquinone of Azotobacter vinelandii Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide Oxidase Activity

J. Bacteriol. 98 (1969) 311- 313

SZARKOWSKA, L., KLINGENBERG, M.:

On the Role of Ubiquinone in Mitochondria. Spectrophotometric and Chemical Measurements of Its Redox-reactions

Biochem. Z. 338 (1963) 674-697

TAKAO, K.:

Existence and Properties of Two Malic Enzymes in Escherichia coli - Especially of NAD-linked Enzyme

J. Biochem. 66 (1969) 379-387

TAMIYA, H., YAMAGUTCHI, S.:

Systematische Untersuchungen über das Cytochromspektrum von verschiedenen Mikroorganismen

Acta Phytochim. (Tokyo) 7 (1933) 232

ALLEN, S. ALLEN, M.P.:

The Oxidase System of Heterotrophically Grown
Streptococcus faecalis

Swedish. Biophys. Acta 96 (1965) 395-428

CHALKER, G.:

A New Hemoglobin Agar Medium for the Cultivation
of Bacillus influenzae

Int. Bacteriol. Abt. I Orig. 74 (1914) 189-190

FRIDMAN, T.:

Studies on Bacterial Nutrition. I. Growth of Bacillus
influenzae in Hemoglobinfree Media

J. exp. Med. 33 (1921) 763-771

FRIDMAN, T., ALLEN, O.F.:

Studies on Bacterial Nutrition. II. Growth Accessory
Substances in the Cultivation of Hemophilic Bacteria

J. exp. Med. 34 (1921 a) 97-114

FRIDMAN, T., ALLEN, O.F.:

Studies on Bacterial Nutrition. III. Plant Tissue,
as a Source of Growth Accessory Substances in the
Cultivation of Bacillus influenzae

J. exp. Med. 34 (1921 b) 455-466

THOMAS, A.D., DOELLE, H.W., WESTWOOD, A.W., GORDON, G.L.:

Effect of Oxygen on Several Enzymes Involved in the
Aerobic and Anaerobic Utilization of Glucose in
Escherichia coli

J. Bacteriol. 112 (1972) 1099-1105

PUNSVALL, G.:

Studies on Bacillus influenzae. Biochemical Activities
Acta path. microbiol. scand. 29 (1951) 387-396

FRIDMAN, T., ALLEN, O.F., STAFFER, J.F.:

Bacterial Techniques 4th ed. Burgess Publishing Co.,
Minneapolis, 1964

WELTE, D. H.:

Experimentelle Untersuchungen zur Rolle der Photosynthese auf der Erde
Naturwissenschaften 57 (1970) 17-22

WHISTANCE, G.R., THRELFALL, D.R.:

Effect of Acetaminophen on the Growth of
Haemophilus parainfluenzae, Haemophilus influenzae,
Haemophilus influenzae, Haemophilus influenzae and Haemophilus
punctata

Biochem. J. 108 (1968) 505-507

WHISTANCE, G.R., THRELFALL, D.R., THRELFALL, D.R.
The Role of Acetaminophen in the Growth and Development
of Haemophilus influenzae and Haemophilus
punctata

Biochem. J. 111 (1969) 461-472

WHITE, D.C.:

Cytotoxicity and Metabolic Pathways of Haemophilus
parainfluenzae

J. Bacteriol. 83 (1962) 851-859

WHITE, D.C.:

Respiratory System of the Haemophilus
parainfluenzae Species

J. Bacteriol. 85 (1963) 84-96

WHITE, D.C.:

Differential Synthesis of Haemophilus
parainfluenzae and Haemophilus
parainfluenzae

J. Biol. Chem. 239 (1964) 2055-2060

WHITE, D.C.:

The Function of 2-Benzoyl Vitamin K_2 in the Electron
Transport System of Haemophilus
parainfluenzae

J. Biol. Chem. 240 (1965 a) 1387-1394

WHITE, D.C.:

Synthesis of 2-Benzoyl Vitamin K_2 and the Cytochrome
System in Haemophilus

J. Bacteriol. 89 (1965 b) 299-305

WHITE, D.C.:

The Obligatory Involvement of the Electron Transport System in the Catabolic Metabolism of Haemophilus parainfluenzae

Ant. v. Leeuwenhoek 32 (1966) 139-158

WHITE, D.C.:

Effect of Glucose on the Formation of the Membran-bound Electron Transport System in Haemophilus parainfluenzae

J. Bacteriol. 93 (1967) 567-573

WHITE, D.C., GRANICK, S.:

Hemin Biosynthesis in Haemophilus

J. Bacteriol. 85 (1963) 842-850

WHITE, D.C., SINCLAIR, P.R.:

Branched Electron Transport System in Bacteria, in Advances in Microbial Physiology Vol. 5, A.H. Rose & J.F. Wilkinson (eds), p. 173-211, Academic Press, New York, 1971

WHITE, D.C., SMITH, L.:

Hematin Enzymes of Haemophilus parainfluenzae

J. biol. Chem. 237 (1962) 1332-1336

WHITE, D.C., SMITH, L.:

Localisation of the Enzymes that Catalyse Hydrogen and Electron Transport in Haemophilus parainfluenzae and the Nature of the Respiratory Chain System

J. biol. Chem. 239 (1964) 3956-3963

WHITE, D.C., TUCKER, A.N.:

Phospholipid Metabolism During Changes in the Proportions of Membran-bound Respiratory Pigments in Haemophilus parainfluenzae

J. Bacteriol. 97 (1969) 199-209

WINSLOW, C., BROADHURST, A.J., BUCHANAN, R.E.,
KRUMMWIEDE, C., ROGERS, L.A., SMITH, G.H.:
The Families and Genera of the Bacteria. Preliminary
Report of the Committee of the Society of American
Bacteriologists on Characterization and Classification
of Bacterial Types
J. Bacteriol. 2 (1917) 505-566

WOOD, W.A.:
Assay of Enzymes Representative of Metabolic Pathways
in Methods in Microbiology Vol. 6 A, J.R. Norris &
D.W. Ribbons (eds), p. 411-424, Academic Press,
New York, 1971

ZABEL, R.:
Cytochrome und respiratorische Chinone einiger
chemo-organotropher, fermentativer, gram-negativer
Bakterien aus der Ordnung Pseudomonadales und der
Familie Brucellaceae
Med. Dissertation, Marburg, 1974

ZINNEMANN, K., BIBERSTEIN, E.L.:
Genus Haemophilus, in Bergey's Manual of Determinative
Bacteriology 8th ed., R.E. Buchanan et al. (eds),
p. 364-370, Williams & Wilkins Co., Baltimore, 1974

ZINNEMANN, K., ROGERS, K.B., FRAZER, J., BOYCE, J.M.H.:
A New V-dependent Haemophilus-Species Preferring
Increased CO₂ Tension for Growth and Named Haemophilus
paraphrophilus
J. Path. Bacteriol. 96 (1968) 413-419

ZINNEMANN, K., ROGERS, K.B., FRAZER, J., DEVARAJ, S.K.:
A Haemolytic V-dependent CO₂-preferring Haemophilus-
Species Haemophilus paraphrohaemolyticus Noc.Spec.
J. med. Microbiol. 4 (1971) 139-143

Lebenslauf

10. Januar 1947 Geboren als Sohn des Beamten Paul Holländer und seiner Ehefrau Anna Holländer geb. Stadtmann in Bottrop
- 1953-1957 Besuch der katholischen Volksschule in Bottrop
- 1957-1966 Besuch des städtischen Jungengymnasiums in Bottrop
- Februar 1966 Reifeprüfung
- Oktober 1966 Grundwehrdienst in Holzminden, an-
-September 1968 schließend Zeitsoldat in Münster
- WS 1968/69 Studium der Biologie an der Philipps-
- SS 1972 Universität Marburg/Lahn und mündliche Diplomhauptprüfung
- Juni 1973 Abschluß des Studiums mit einer experimentellen Diplomarbeit angefertigt im Hygiene-Institut der Universität über: "Die phänotypische Charakterisierung von Vertretern der Gattung Haemophilus Winslow et al. unter besonderer Berücksichtigung der Zusammensetzung der Atmungskette"
- seit Juli 1973 Wissenschaftlicher Angestellter im Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg/Lahn, Hygiene-Institut
Gleichzeitig unter Anleitung von Prof. Dr. W. Mannheim Anfertigung einer Dissertation
- Februar 1974 Heirat mit der Arzthelferin Hiltrud Otto

Die vorliegende Arbeit entstand im Hygiene-Institut des Fachbereichs Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg/Lahn.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. W.Mannheim für die Themenstellung und für die ständige Betreuung und Förderung der Arbeit.

Ebenso danken möchte ich Herrn PD Dr. A.Kröger für die Unterstützung bei einigen Experimenten und die anregenden Diskussionen, ferner allen Kollegen für ihre stete Hilfsbereitschaft.

Einige Ergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

R.HOLLÄNDER & W.MANNHEIM: Characterization of Hemophilic and Related Bacteria by Their Respiratory Quinones and Cytochromes.

Int. J. System. Bacteriol. 25 (1975) 102-107

